

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340938/18243	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 00/01747	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/06/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/06/1999
Déposant		

ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 6 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégué,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

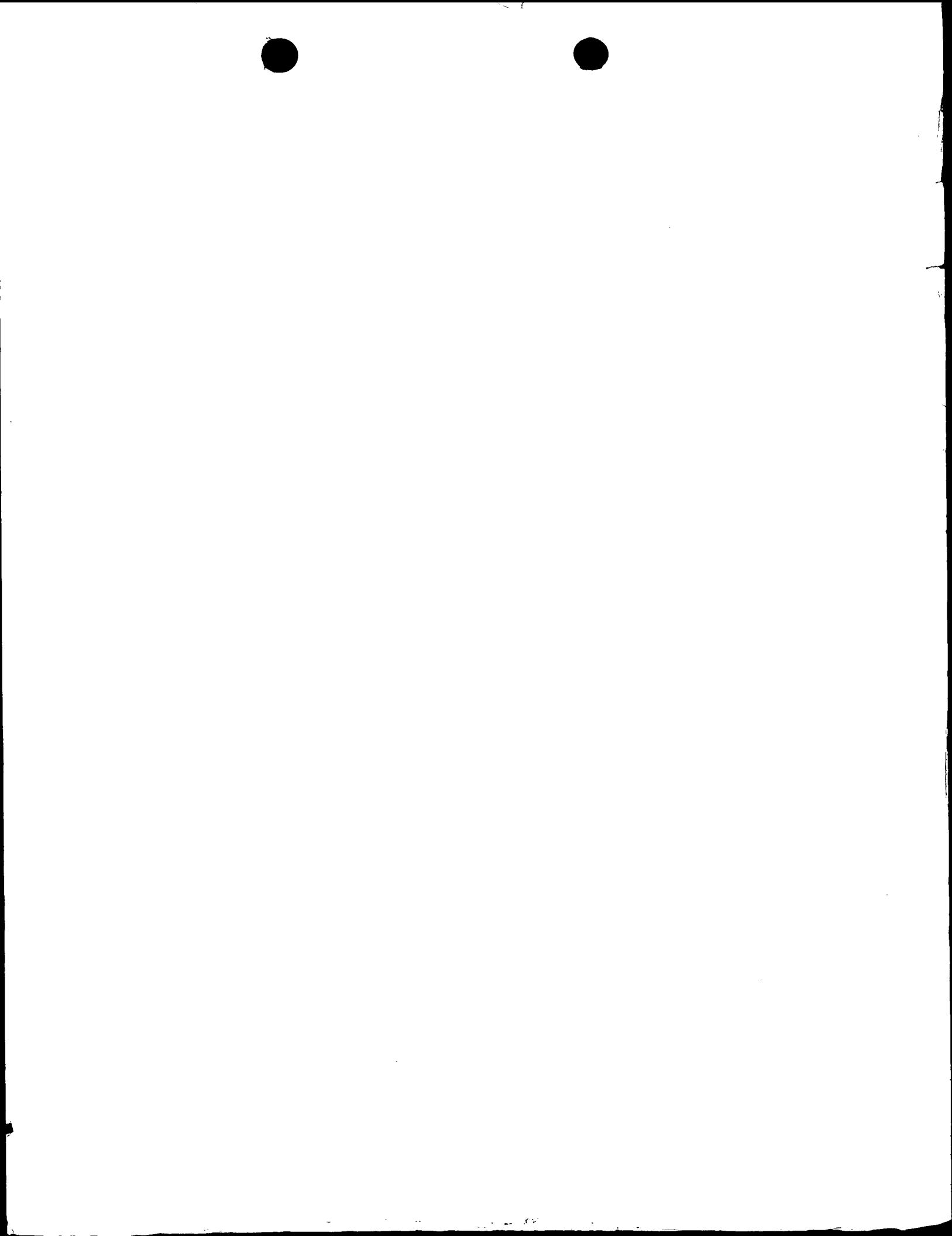
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 00/01747

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7	C12N15/12	C07K14/435	C07K14/47	C12N15/10	C12N15/66
	C12N15/11	C12Q1/68	C07K16/18	G01N33/53	A61K51/00
	A61P35/00				

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

STRAND, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PASCAL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 août 1998 (1998-08-18), XP002133353 HINXTON, GB AC= AI084125. qf23e08.x1 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1750886 3' similar to TR:015871 015871 UBIQUITIN ;, mRNA sequence. EST. abrégé</p> <p>---</p> <p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 avril 1997 (1997-04-18), XP002133354 HINXTON, GB AC= AA354253. EST62518 Jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA 5' end. abrégé</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	2,3,6,7
X		2,6,7

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 septembre 2000

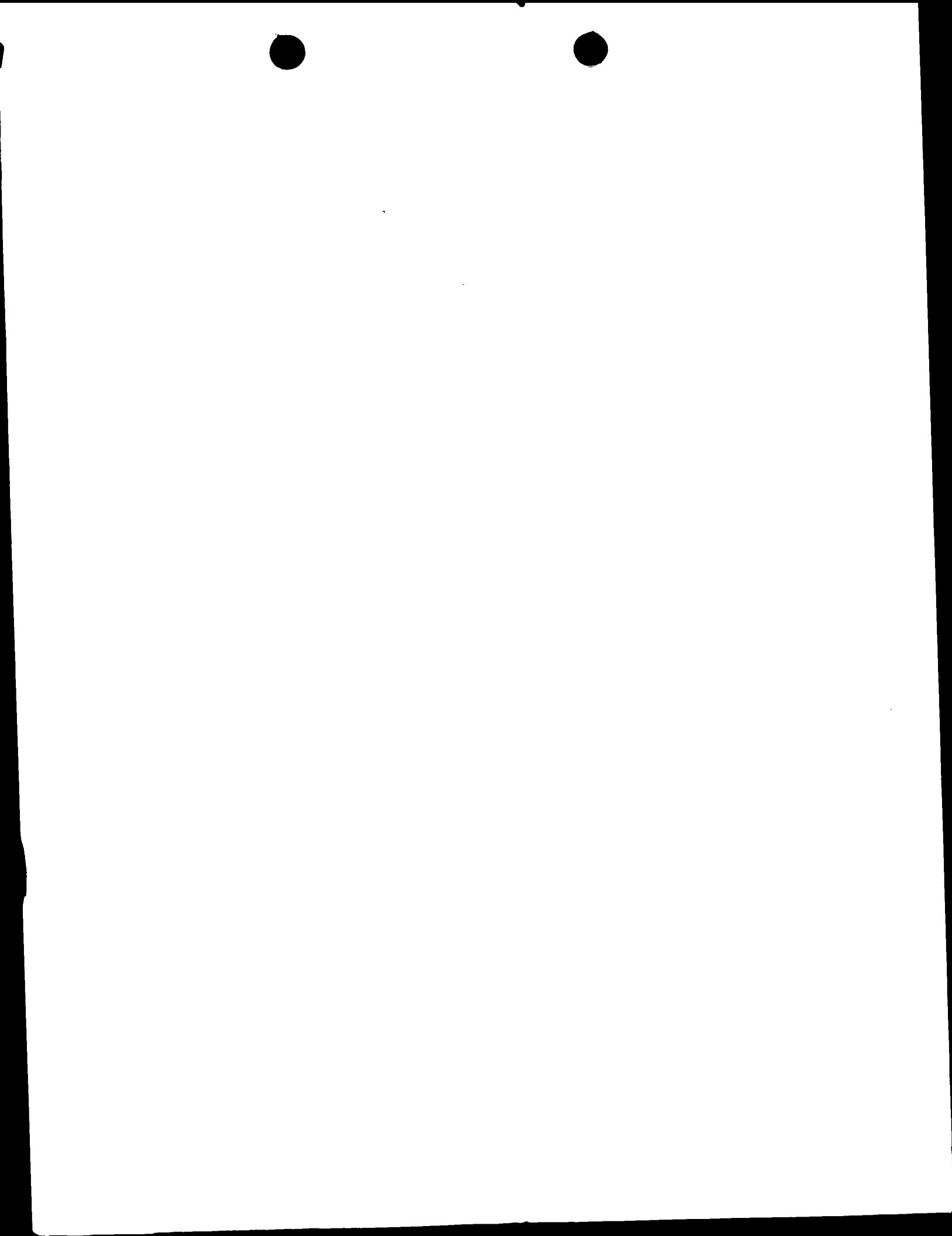
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.



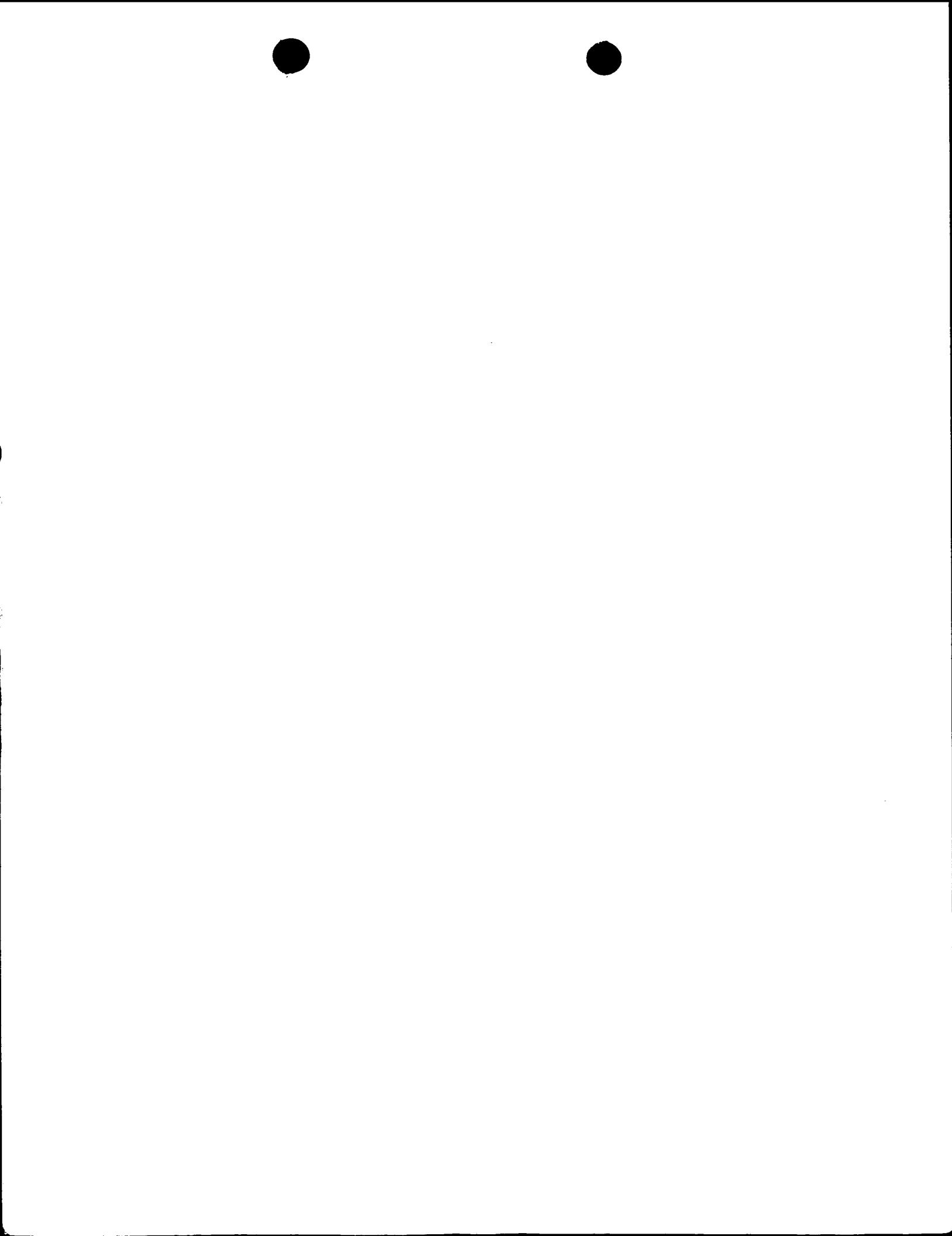
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 00/01747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FUJIMORI A. ET AL.,: "Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation." MAMMALIAN GENOME, vol. 9, no. 12, 1998, page 1032-1035 XP000890078 abrégé; figure 1 page 1034, colonne de gauche, dernier alinéa -page 1035, colonne de droite, alinéa 1 ---	2,3,6,7, 27,29
A	WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID ; IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 août 1998 (1998-08-27) page 3, ligne 1-10 page 4, ligne 27 -page 5, ligne 28 page 18, ligne 28 -page 19, ligne 30 page 20, ligne 19 -page 2, ligne 23 page 33, ligne 13 -page 35, ligne 15 page 36, ligne 15 -page 40, ligne 22; exemples 1-3 ---	1,12,13, 27,29-35
A	SANDRI M I ET AL: "P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 22, 15 novembre 1996 (1996-11-15), pages 4464-4470, XP002068824 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande abrégé page 4469, colonne de gauche, dernière ligne -colonne de droite, alinéa 3 ---	1,27, 29-35
A	ISAACS RJ T AL.,: "Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence arrested cells." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 juillet 1996 (1996-07-12), pages 16741-16747, XP002133355 cité dans la demande abrégé page 16744, colonne de droite, alinéa 2 -page 16746, colonne de gauche, alinéa 1 ---	1,4,5,9, 10, 12-21, 27,29,31
		-/-



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

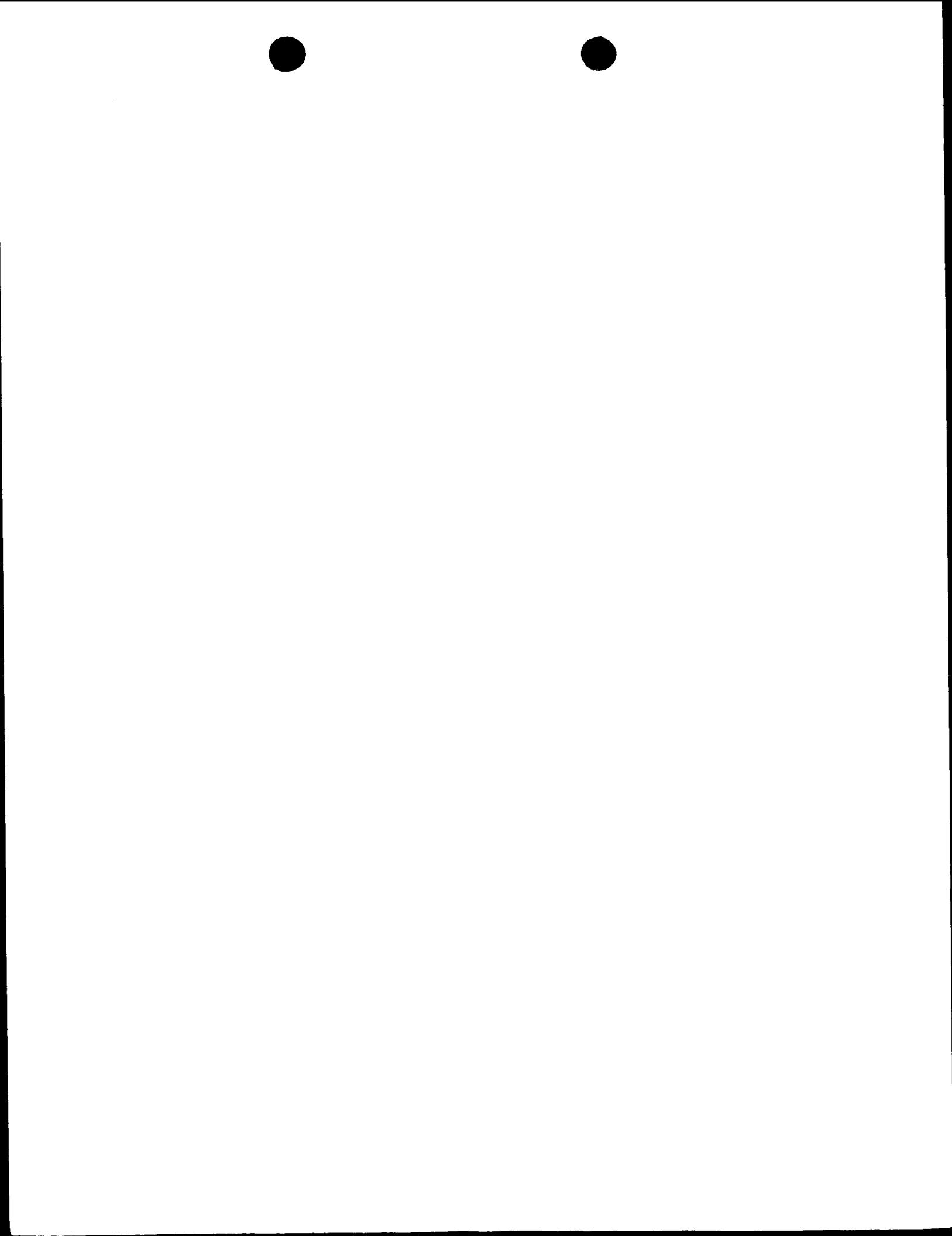
Demande Internationale No

PCT/FR 00/01747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HERZOG C E AND ZWELLING L A: "Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase IIalpha promoter" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, 1997, pages 608-612, XP000877157 cité dans la demande page 609, colonne de droite, dernier alinéa -page 612, colonne de gauche, dernier alinéa ---	1-5,10, 12-21, 27,29,31
A	LIM K ET AL.: "Reduced level of ATF is corelated with transcriptional repression of DNA topoisomerase IIalpha gene during TPA-induced differentiation of HL-60 cells" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 1, septembre 1998 (1998-09), pages 35-42, XP000900088 cité dans la demande abrégé page 38, dernier alinéa -page 46, alinéa 1 ---	1-5,27
A	KUBO T ET AL.: "DNA topoisomerase IIalpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 55, 1 septembre 1995 (1995-09-01), pages 3860-3864, XP000877419 cité dans la demande page 3861, alinéa 3 -page 3864, alinéa 1 ---	1-5,27
P,X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 3 avril 2000 (2000-04-03), XP002148667 HINXTON, GB AC = AC027319. Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-518P12, WORKING DRAFT SEQUENCE, 84 unordered pieces. HTG; HTGS_DRAFT; HTGS_PHASE1. FROM NT 231122-232485. abrégé ---	14
P,X	HOPFNER R ET AL.: "ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression." CANCER RESEARCH, vol. 60 (1), 1 janvier 2000 (2000-01-01), page 121-8 XP000884566 le document en entier ---	1-36

-/-



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/01747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>WO 99 38972 A (CRKVENJAKOV RADOMIR ; JONES WILLIAM LEE (US); STACHE CRAIN BIRJIT () 5 août 1999 (1999-08-05)</p> <p>SEQ. ID. N. 944 abrégé page 5-6 page 55-57</p> <p>-----</p>	<p>2, 6, 7, 16, 20, 24, 26, 29, 30, 32, 35, 36</p>



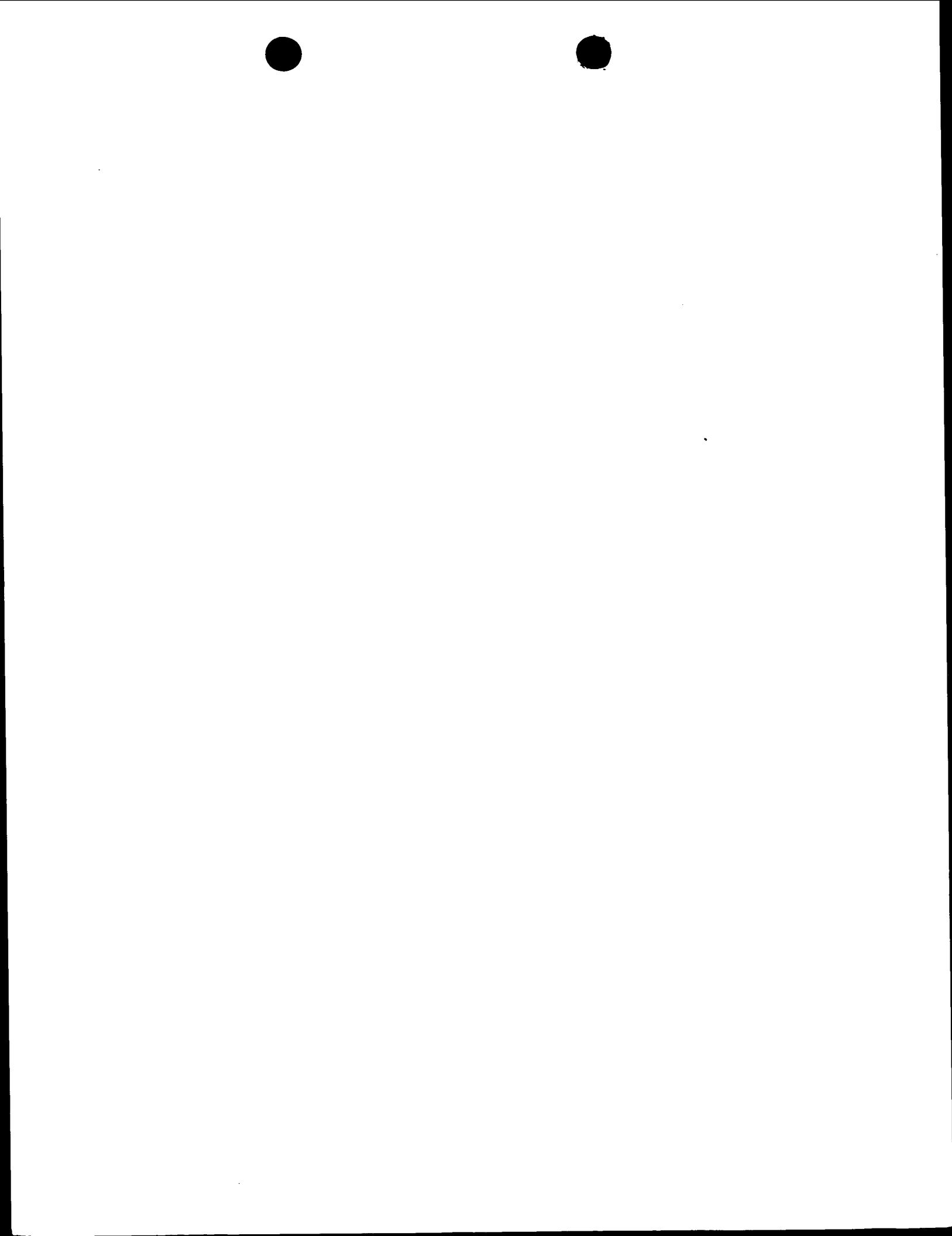
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01747

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9837207	A 27-08-1998	AU 6300798	A	09-09-1998
WO 9938972	A 05-08-1999	AU 2471699	A	16-08-1999
		AU 2095599	A	19-07-1999
		AU 4187499	A	29-11-1999
		WO 9933982	A	08-07-1999
		WO 9958675	A	18-11-1999
		AU 6263999	A	17-04-2000
		WO 0018916	A	06-04-2000



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/GB 98/00551A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/63 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	GB 2 305 920 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 23 April 1997 cited in the application see page 46, line 10 - page 61 ---	1,2,6-9, 11-23
Y	TSUTSUMI-ISHII Y ET AL: "RESPONSE OF HEAT SHOCK ELEMENT WITHIN THE HUMAN HSP70 PROMOTER TO MUTATED P53 GENES" CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, vol. 6, no. 1, January 1995, pages 1-8, XP000616356 see page 5, right-hand column, paragraph 2 ---	3
Y	---	3

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 1998

Date of mailing of the international search report

06.07.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 98/00551

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUBER B E ET AL: "VDEPT: AN ENZYME/PRODRUG GENE THERAPY APPROACH FOR THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 17, no. 3, 5 December 1995, pages 279-292, XP000654839 see figure 1 ---	1,2,6-23
A	HARRIS J D ET AL: "GENE THERAPY FOR CANCER USING TUMOUR-SPECIFIC PRODRUG ACTIVATION" GENE THERAPY, vol. 1, no. 3, May 1994, pages 170-175, XP000654731 see abstract ---	1,2,6-23
A	SANDRI MI ET AL: "P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, no. 22, 15 November 1996, OXFORD GB, pages 4464-4470, XP002068824 cited in the application see page 4469, right-hand column, paragraph 1 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. ...ional application No.
PCT/GB 98/00551

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 18-20 are directed to a method of treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the genetic construct.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/GB 98/00551

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 2305920 A	23-04-1997	AU	7138696 A	28-04-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)
08 mars 2001 (08.03.01)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340938/18243

Demande internationale no	Date du dépôt international (jour/mois/année)
PCT/FR00/01747	22 juin 2000 (22.06.00)

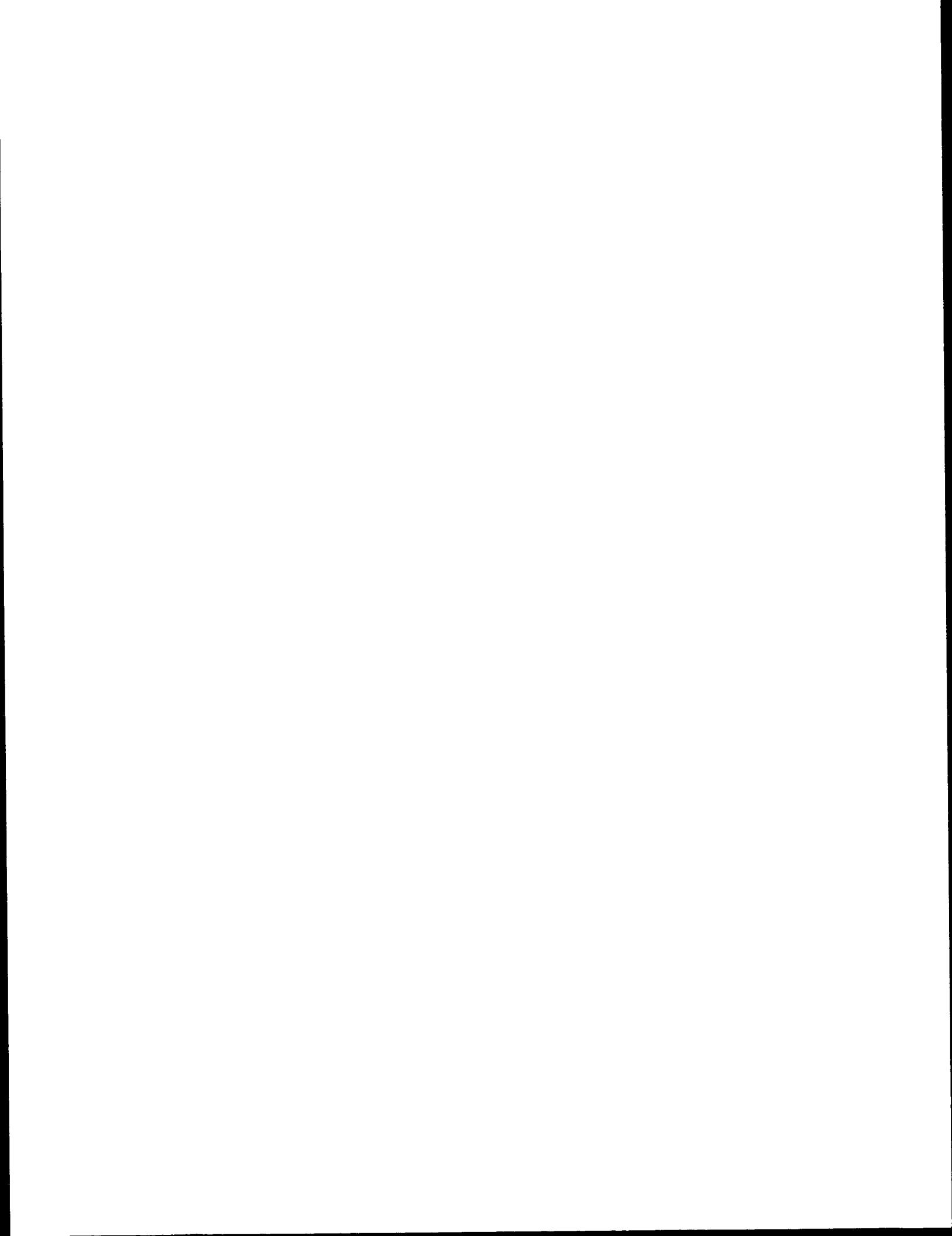
1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> le déposant <input type="checkbox"/> l'inventeur <input checked="" type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun		
Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01-45-00-92-02	
	no de télécopieur 01-45-00-46-12	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne <input type="checkbox"/> le nom <input checked="" type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile		
Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01-44-29-35-00	
	no de télécopieur 01-44-29-35-99	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:
--

4. Une copie de cette notification a été envoyée:	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur <input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale <input type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices désignés concernés <input type="checkbox"/> aux offices élus concernés <input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE REVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 05 avril 2001 (05.04.01)	Destinataire:
Demande internationale no PCT/FR00/01747	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340938/18243
Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 juin 2000 (22.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Déposant BRONNER, Christian etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

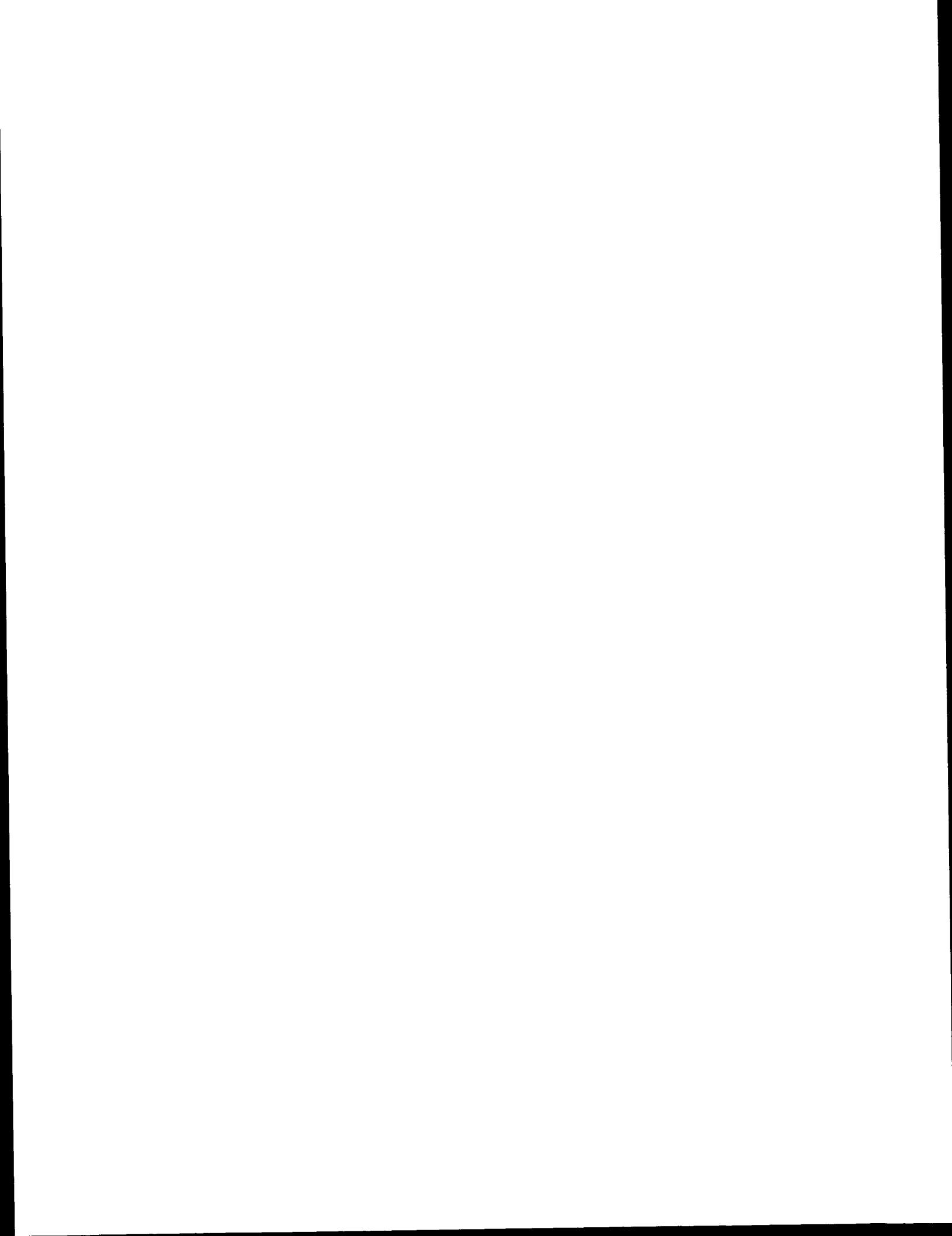
15 janvier 2001 (15.01.01)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombelettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Antonia Muller
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38



TRAITE DE L'OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 novembre 2001 (06.11.01)			
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340938/18243	NOTIFICATION IMPORTANTE		
Demande internationale no PCT/FR00/01747	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 juin 2000 (22.06.00)		

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

le déposant l'inventeur le mandataire le représentant commun

Nom et adresse ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN GENETIQUE MOLECULAIRE (ADEREGEM) 231, rue de Charenton F-75012 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	FR	FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
no de télécopieur		

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

la personne le nom l'adresse la nationalité le domicile

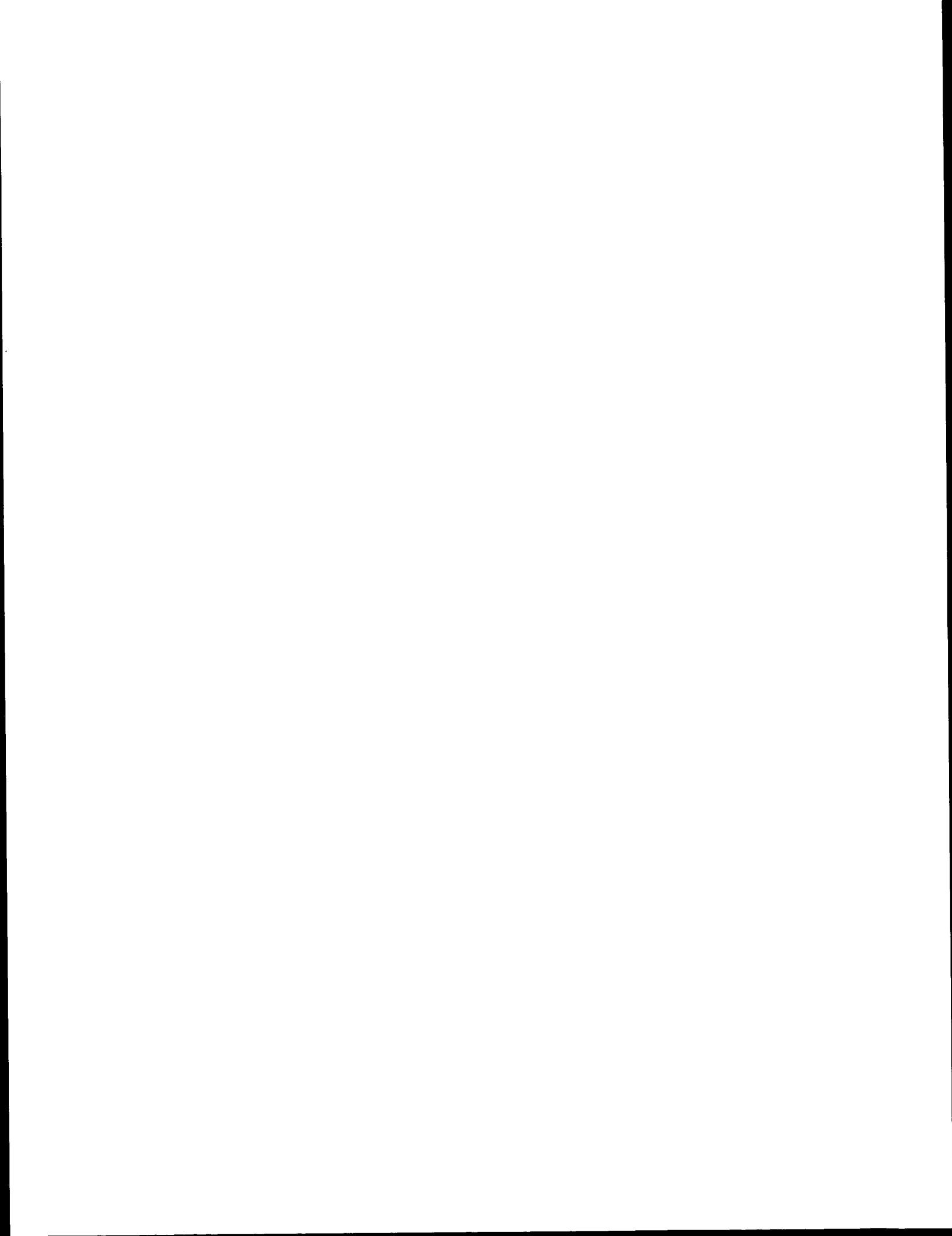
Nom et adresse INSTITUT NATIONAL DE SANTE ET DE RECHERCHE MEDICALE 101, rue de Tolbiac F-75654 Paris Cedex 13 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	FR	FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
no de télécopieur		

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombelettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Brigitte WYSS (Fax 338.87.40) no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---



In the matter of the UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application N° :

U.S. National Serial N° :

Filed :

PCT International Application N° : PCT/FR00/01747

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below ;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application N°. PCT/FR00/01747 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willfull false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willfull false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date : 14th day of December 2001

Full name of the translator : Mrs CRESPEL



For and on behalf of ART INTERNATIONAL

Post office address :

BP 114 95170 DEUIL LA BARRE / FRANCE



PCT

REC'D 17 OCT 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340938/18243	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR00/01747	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999

Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB
C12N15/12

Déposant

~~ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT... et al. INSTITUT NATIONAL DES SANTE ...~~

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 12 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
<input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 15/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 15.10.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Surdej, P N° de téléphone +49 89 2399 7334





RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01747

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)):

Description, pages:

1-72 version initiale

Revendicaciones, N°:

1-39 version initiale

Dessins, feuilles:

1/11-11/11 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-11. telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

de la description, pages :
 des revendications, n°s :
 des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :

copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
 traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.

2. Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

l'ensemble de la demande internationale.
 les revendications n°s 31-35,37(toutes partiellement),39(complètement).

parce que :



- la demande internationale, ou les revendications n°s 39(complétement) en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
voir feuille séparée
- la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s 31-35,37(toutes partiellement) en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
voir feuille séparée
- les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:

- le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
 - limité les revendications.
 - payé des taxes additionnelles.
 - payé des taxes additionnelles sous réserve.
 - ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1,13.2 et 13.3,
 - il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
 - il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :



- toutes les parties de la demande.
- les parties relatives aux revendications n°s.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1,5-6,11,19-20,28-30,36-37,39 Non : Revendications 2-4,7-10,12-18,21-27,31-35,38
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-39
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-38 Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

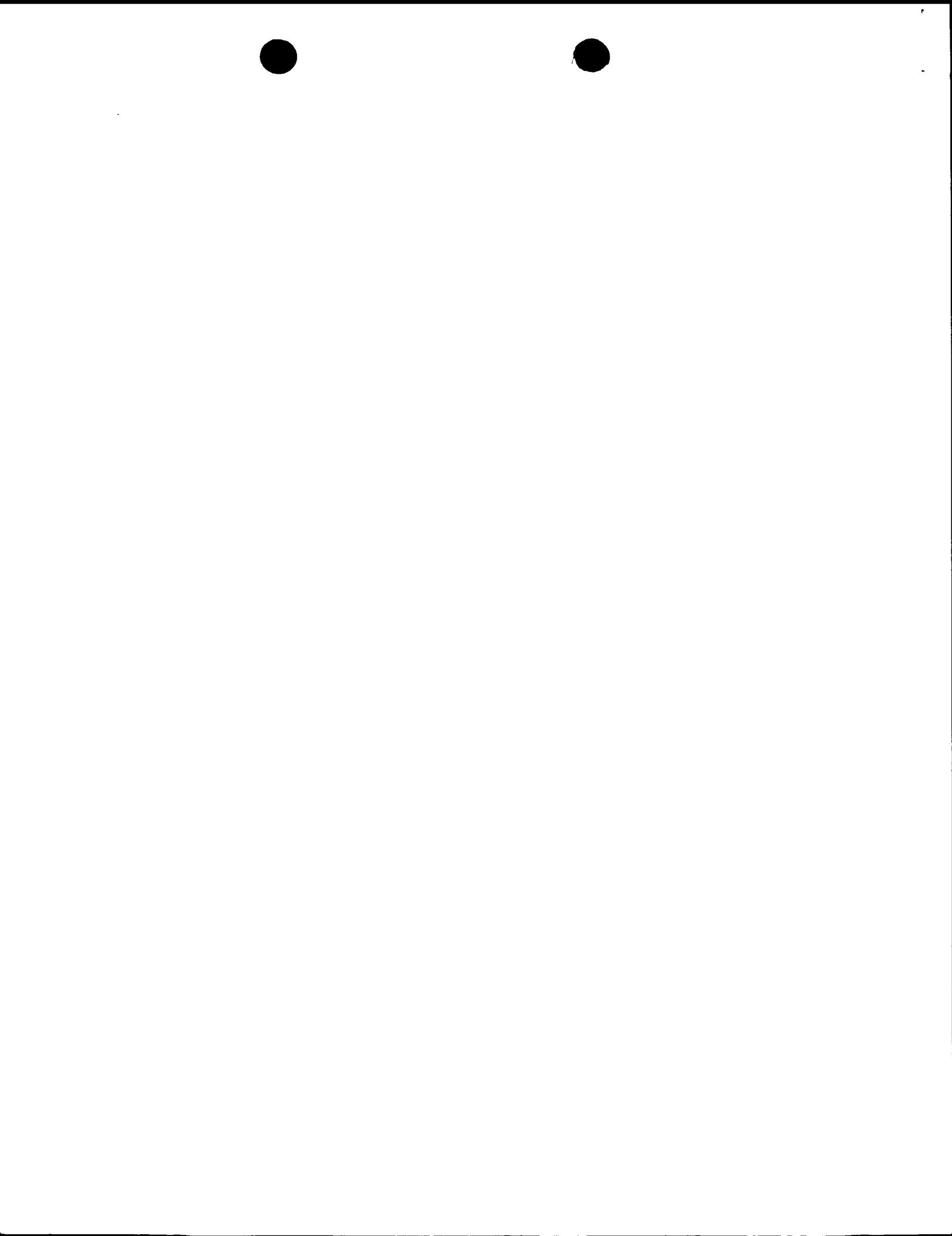
VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou
2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Il est fait référence aux documents suivants:

D1: DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 août 1998 (1998-08-18), HINXTON, GB

D2: DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 avril 1997 (1997-04-18), HINXTON, GB

D3: FUJIMORI A. ET AL.,: 'Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation.' MAMMALIAN GENOME, vol. 9, no. 12, 1998, page 1032-1035

D4: WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID ;IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 août 1998 (1998-08-27)

D5: SANDRI M I ET AL: 'P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE' NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 22, 15 novembre 1996 (1996-11-15), pages 4464-4470, cité dans la demande

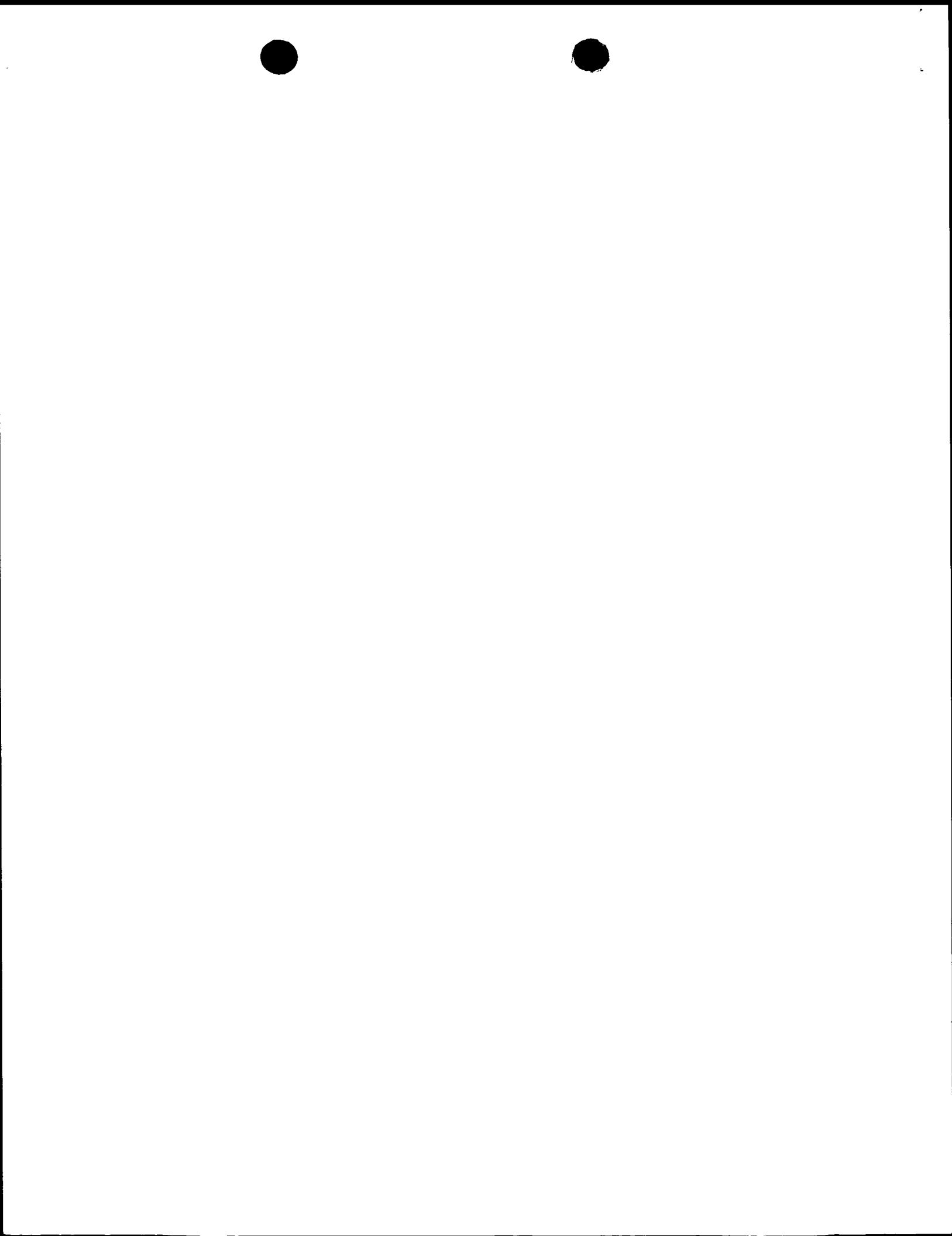
D6: ISAACS RJ T AL.,: 'Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence arrested cells.' THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 juillet 1996 (1996-07-12), pages 16741-16747, cité dans la demande

D7: HERZOG C E AND ZWELLING L A: 'Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase IIalpha promoter' BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, 1997, pages 608-612, cité dans la demande

D8: LIM K ET AL.: 'Reduced level of ATF is corelated with transcriptional repression of DNA topoisomerase IIalpha gene during TPA-induced differentiation of HL-60 cells' BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 1, septembre 1998 (1998-09), pages 35-42, cité dans la demande

D9: KUBO T ET AL.,: 'DNA topoisomerase IIalpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells' CANCER RESEARCH, vol. 55, 1 septembre 1995 (1995-09-01), pages 3860-3864, cité dans la demande

D10: HOPFNER R ET AL.,: 'ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression.' CANCER RESEARCH, vol. 60 (1), 1 janvier 2000 (2000-01-01), page



121-8

D11: WO 99 38972 A (CRKVENJAKOV RADOMIR ;JONES WILLIAM LEE (US); STACHE CRAIN BIRJIT () 5 août 1999 (1999-08-05)

Les comparaisons de séquences sont connues de l'Applicant.

Introduction

La demande divulgue un polypeptide humain ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein 90) qui se lie sur une boîte CCAAT, un vecteur recombinant contenant un polynucléotide codant ledit polypeptide, une cellule hôte transformée par ledit vecteur, un anticorps se liant spécifiquement audit polypeptide, ainsi que leur utilisation notamment dans le traitement de la prolifération cellulaire et/ou du cancer.

Concernant le point II

Priorité

1. La présente demande revendique la priorité de la demande FR99/07935 (P1) déposée le 22 juin 1999.
La séquence SEQ ID No. 12 revendiquée n'est pas divulguée dans P1.
La date de priorité de P1 ne peut donc pas être reconnue pour ladite séquence et seule la date de dépôt de la présente demande est valide pour considérer l'objet des revendications faisant référence à ladite séquence.
Puisque les documents D10 et D11 ont été publié avant la date de dépôt de la présente demande, ils peuvent être considérés comme art antérieur pour l'objet de la demande ne bénéficiant pas de la date de priorité de P1.

Concernant le point III

Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

2. Aucune opinion n'est établie partiellement sur l'objet de la revendication 31 et des revendications y faisant référence dans la mesure où elles ne concernent pas les anticorps ou polynucléotides revendiqués dans la demande. Le ligand de la revendication 31 est défini entièrement par le procédé pour l'obtenir, ledit ligand



n'est absolument pas défini et aucune véritable caractéristique technique ne peut être dérivée de l'objet de la revendication 31 pour déterminer la nature dudit ligand, à l'exception faite des anticorps et polynucléotides revendiqués. En conséquence, aucune opinion n'est établie sur lesdites parties de revendications.

3. La présente Administration considère que l'objet de la **revendication 39** est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de cette revendication est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

4. La date de priorité de P1 n'est pas valide pour la séquence SEQ ID No. 12 et seule la date de dépôt de la présente demande est prise en compte. Les documents D10 et D11 sont donc considérés comme état antérieur de la technique pour l'objet concernant cette séquence (voir point II). L'objet des revendications 12 et 13 auxquelles fait référence la revendication 14, n'est pas nouveau à la date de dépôt de la présente demande en considérant D10 et D11 qui divulguent des vecteurs ayant toutes les caractéristiques techniques mentionnées dans les revendications 12 et 13 (e.g. D10: pages 122 et 124, D11: page 3, ligne 4, page 14, ligne 10, page 16). L'objet, de la revendication 14 et des revendications y faisant référence, ne forme donc pas un concept inventif unique, tel que définit dans la Règle 13 PCT, avec le reste de l'objet revendiqué dans la demande. La revendication 14 et l'objet dépendant de cette revendication forme donc une invention séparée du reste de l'objet revendiqué.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Nouveauté et activité inventive (Art. 33 (1)-(3) PCT)

5. Plusieurs critères utilisés pour définir l'invention ne sont pas clairs et vont à

l'encontre de l'Article 6 PCT, ce qui conduit à des objections quant à la nouveauté et de l'inventivité de l'objet revendiqué (voir points 15-19):

6. **Les revendications 2-4, 7-10, 12-13, 15-18, 21-27, 31-35, 38** ne sont pas nouvelles en tenant compte de D3. D3 divulgue le clonage d'un gène codant une protéine nucléaire de souris (Np95) qui est associée à la prolifération cellulaire et dont l'expression est aberrante dans les cellules de lymphome (e.g. résumé, pages 1032 et 1034). La séquence de Np95 est 73,4% identique (85% similaire) à la séquence SEQ ID No. 2 de la présente demande sur la longueur totale (voir les comparaisons de séquences: page 9). Np95 comporte au moins un domaine de fixation à l'ADN (e.g. résumé, page 1034). D3 divulgue aussi des amorces pour l'amplification de séquences nucléiques, des vecteurs (notamment d'expression) contenant des séquences de Np95, des cellules hôtes contenant lesdits vecteurs, des anticorps dirigés contre Np95 et des procédés de détection et/ou de dosage et les nécessaires pour la mise en oeuvre desdits procédés (e.g. abstract, pages 1032-1035).
7. **Les revendications 2-3, 7, 12, 15, 17** ne sont pas nouvelles en considérant D1 et D2. D1 divulgue un EST (Expressed Sequence Tag) EMBL:AI084125 ayant 99,7% d'identité sur 326 nucléotides contenant un motif "leucine zipper" (voir aussi les comparaisons de séquences: pages 2-3). D2 divulgue un EST EMBL:AA354253 ayant 98,3% d'identité sur 350 nucléotides (voir aussi les comparaisons de séquences: pages 4-5).
8. **La revendication 14** n'est pas nouvelle. Le document D11 pouvant être considéré pour l'objet de la revendication 14 (voir point II), l'homme du métier obtiendra obligatoirement le promoteur à partir de l'ADNc divulgué dans D11 (correspondant à la séquence SEQ ID No. 944, pages 153, 220 et comparaisons de séquences: page 8) en utilisant les procédés décrits dans D11 (e.g. page 8, lignes 22-30 et page 10 et suivantes).
9. L'objet des **revendications 1, 5-6, 28-30** est nouveau mais pas inventif en considérant, par exemple D3. Connaissant l'existence d'un gène homologue chez le rat pour le gène np95 de D3 (page 1034, colonne de gauche, 2e paragraphe, page 1035, colonne de gauche, 1er paragraphe), l'homme du métier aurait utilisé

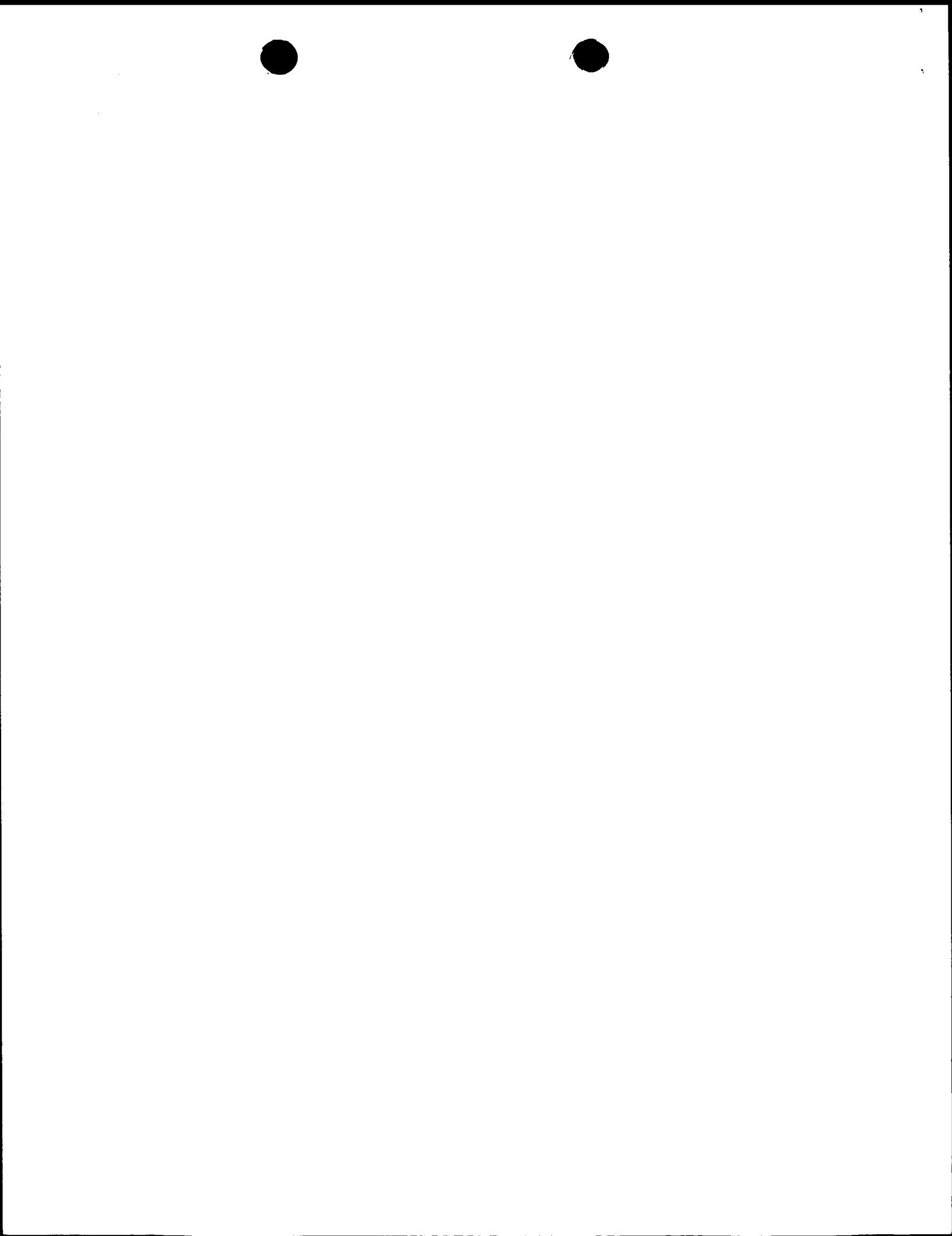


le gène de souris pour obtenir le gène homologue dans d'autre espèces de mammifère, notamment chez l'homme, sans faire preuve d'activité inventive et serait arrivé à l'invention de la demande. Bien que des différences existent au niveau de l'expression transcriptionnelle des gènes np95 et ICBP90 et au niveau structural avec la présence d'un domaine de liaison à l'ATP/GTP qui est présent seulement dans la protéine np95, la comparaison du gène de souris Np95 divulgué dans D3 avec le gène de la présente demande montre, outre la similarité élevée (85%) au niveau de la séquence protéique (voir point 6), une correspondance au niveau des domaines structuraux, en particulier avec la présence d'un domaine "doigt de zinc" de liaison à l'ADN qui suggère que np95 est aussi un facteur de transcription. Les caractéristiques d'expression du gène np95 de souris et du gène humain ICBP90 se recouvrent partiellement et les deux protéines sont impliquées dans la prolifération cellulaire. L'ensemble des caractéristiques communes du Np95 et ICBP90 suggère très fortement que le gène de souris np95 est l'homologue du gène humain divulgué dans la présente demande.

10. L'objet des **revendications 11, 19-20, 36-37 et 39** est évident en appréciant D3 en combinaison avec, par exemple, D4. L'objet des revendications 19-20 n'est pas inventif puisque l'homme du métier aurait considéré la production d'anticorps dirigé contre une protéine connue. Compte tenu de l'enseignement de D3 et D4, combiner l'ensemble des caractéristiques exposées dans la revendication 11 relève d'une démarche technique normale pour la personne du métier. L'objet de desdites revendications n'implique par conséquent pas d'activité inventive.

Application industrielle (Art. 33 (1) and (4) PCT)

11. Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si la **revendication 39** est susceptible d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un



médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

Concernant le point VI

Certains documents cités

12. Certains documents publiés (règle 70.10)

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
D11: WO99/38972	05/08/99	28/01/99	28/01/98

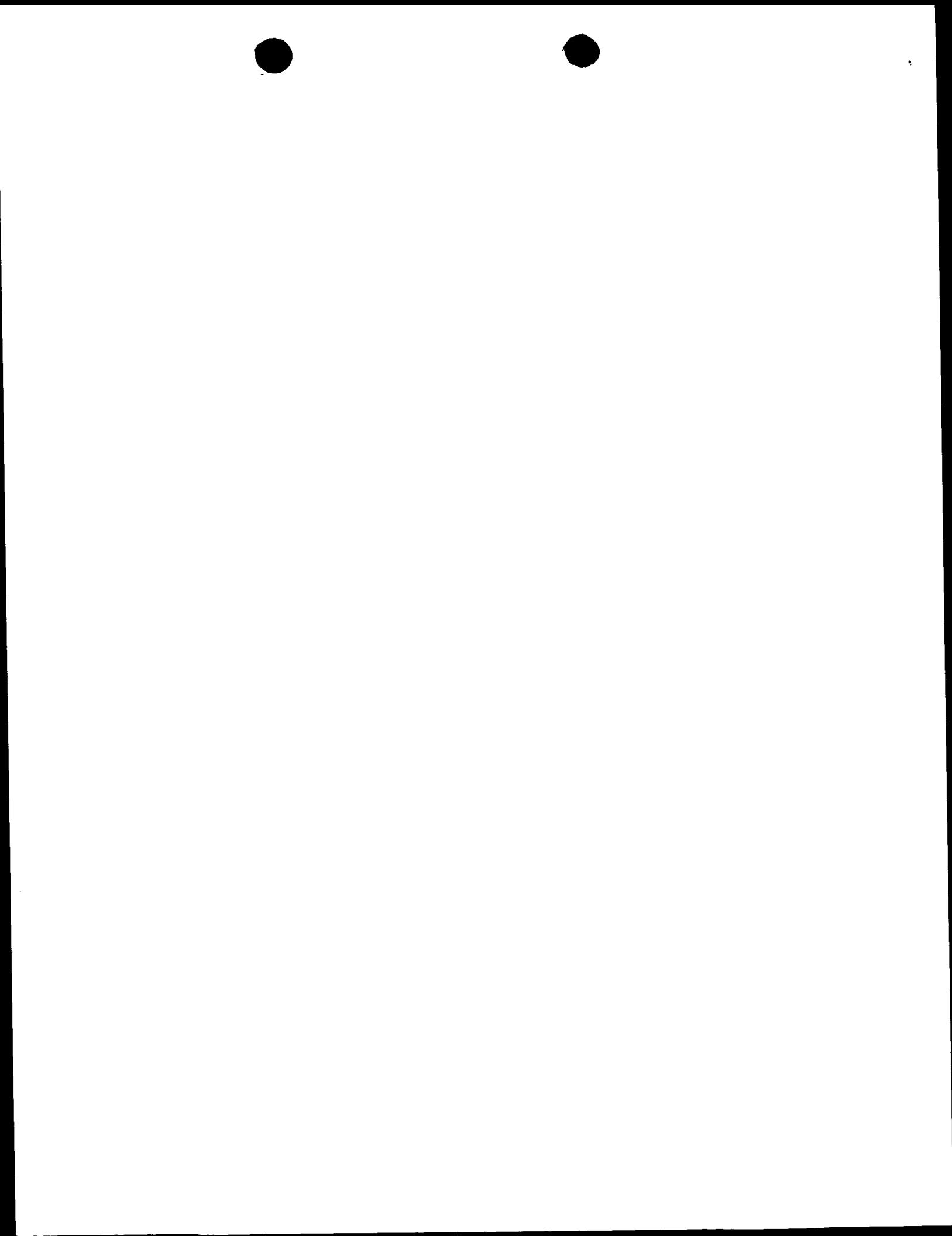
L'attention de la demanderesse est attirée sur le fait que D11 est considéré comme état antérieur de la technique dans certains Etats parties au PCT. L'OEB, par exemple, considère D11 comme préjudiciable pour la nouveauté de l'objet de la présente demande (Article 54(3) and (4) EPC) dans la mesure où les mêmes Etats parties au PCT désignés sont concernés.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

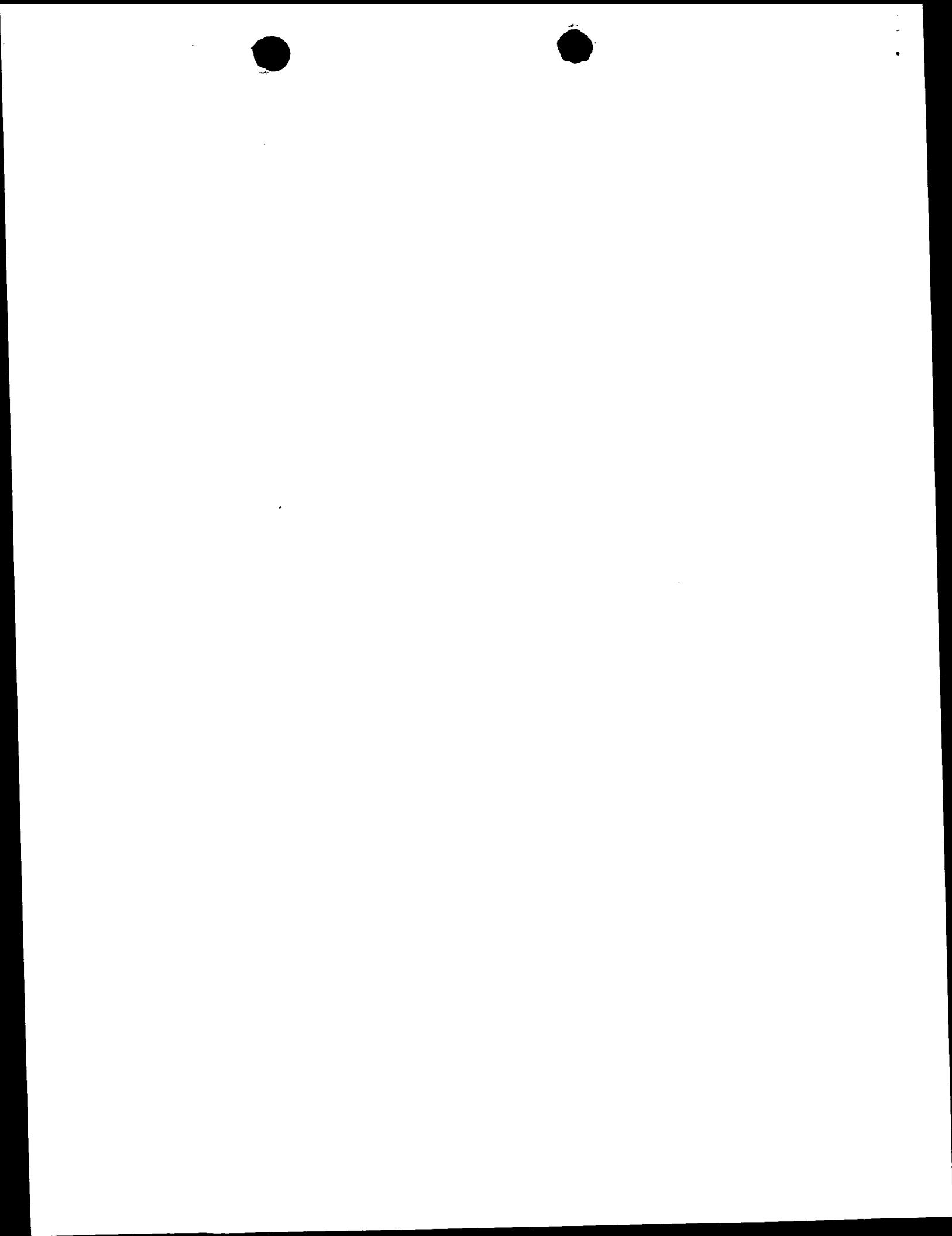
Les observations suivantes sont faites sur la clarté de l'objet revendiqué sous l'Article 6 PCT:

13. Le terme "variant" appliqué à une protéine ou un acide nucléique (e.g. revendication 1) ne donne pas une définition claire desdits produits et il n'est pas possible de déterminer quels sont les composés contenus dans l'étendue desdites revendications.
14. Les revendications (e.g. 2, 7) faisant référence à des séquences "homologues" ou ayant d'un pourcentage d'"homologie" donné comprennent à lumière de la description toute séquence ayant n'importe quel degré de similarité. De plus "% d'homologie" n'a pas de sens. Des séquence homologues sont des séquences qui ont la même origine évolutive, mais qui peuvent n'avoir aucune identité.
15. La longueur des séquences de polynucléotides ou polypeptides n'étant pas



toujours précisée (par exemple dans les revendications 2, 7, 14), des séquences de 2 nucléotides ou 2 amino acides, respectivement, sont comprises dans l'étendue desdites revendications.

16. Les conditions d'hybridation n'étant pas suffisamment précisées (par exemple page 14, lignes 5-11 de la description) pour les polynucléotides revendiqués (e.g. revendications 7, 14), il n'est pas possible de déterminer quelles sont les séquences couvertes par lesdites revendications dans ces conditions.
17. L'expression "biologiquement actif" appliquée à un fragment ne permet pas de déterminer la longueur dudit fragment (par exemple dans la revendication 2) puisque un acide aminé unique dans un contexte approprié peut conférer une activité biologique.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

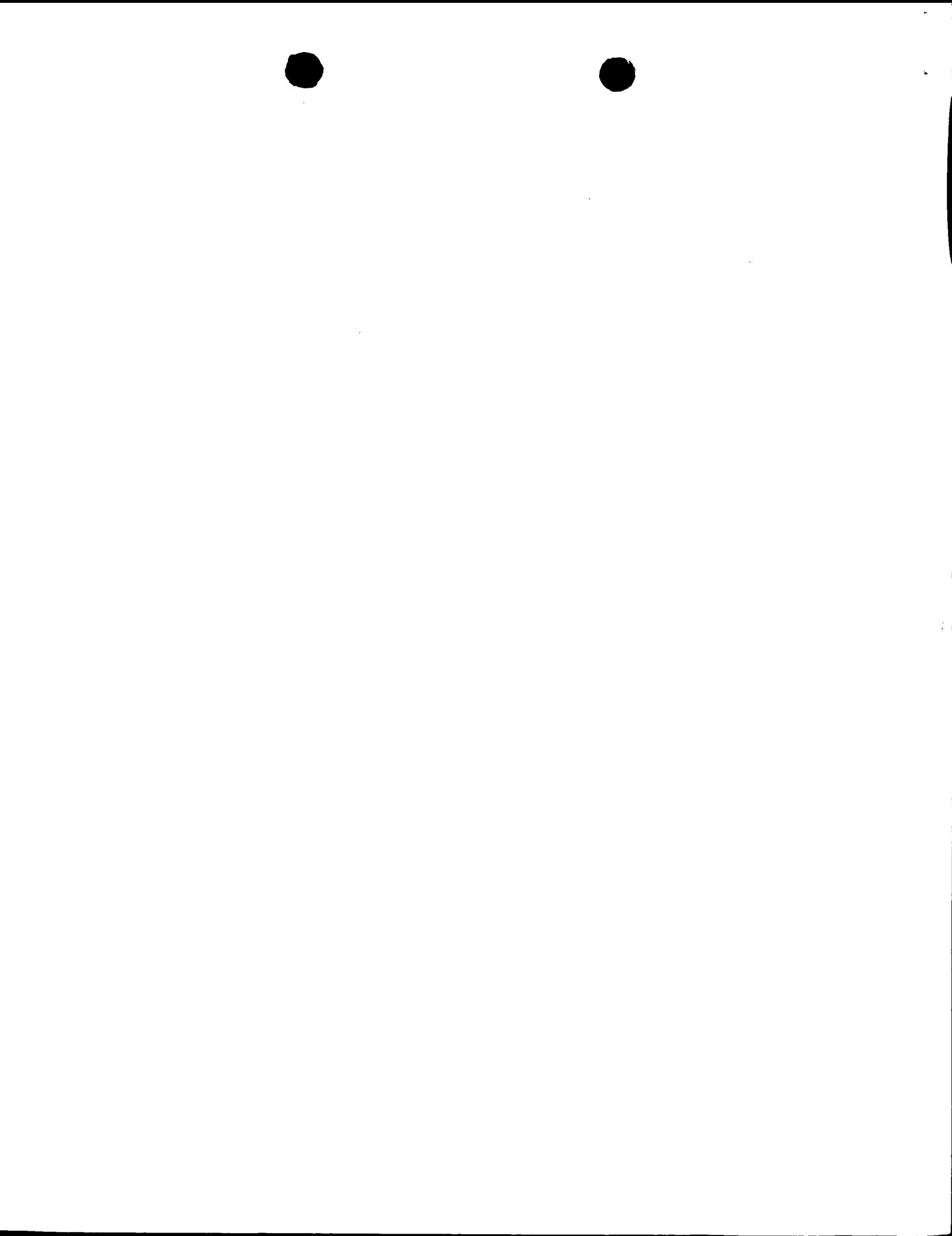
37

10/10/19071

Applicant's or agent's file reference 340938/18243	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR00/01747	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE SANTE ET DE RECHERCHE MEDICALE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>12</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 15 January 2001 (15.01.01)	Date of completion of this report 15 October 2001 (15.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01747

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:pages 1-72, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the claims:pages 1-39, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the drawings:pages 1/11-11/11, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the sequence listing part of the description:pages 1-11, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

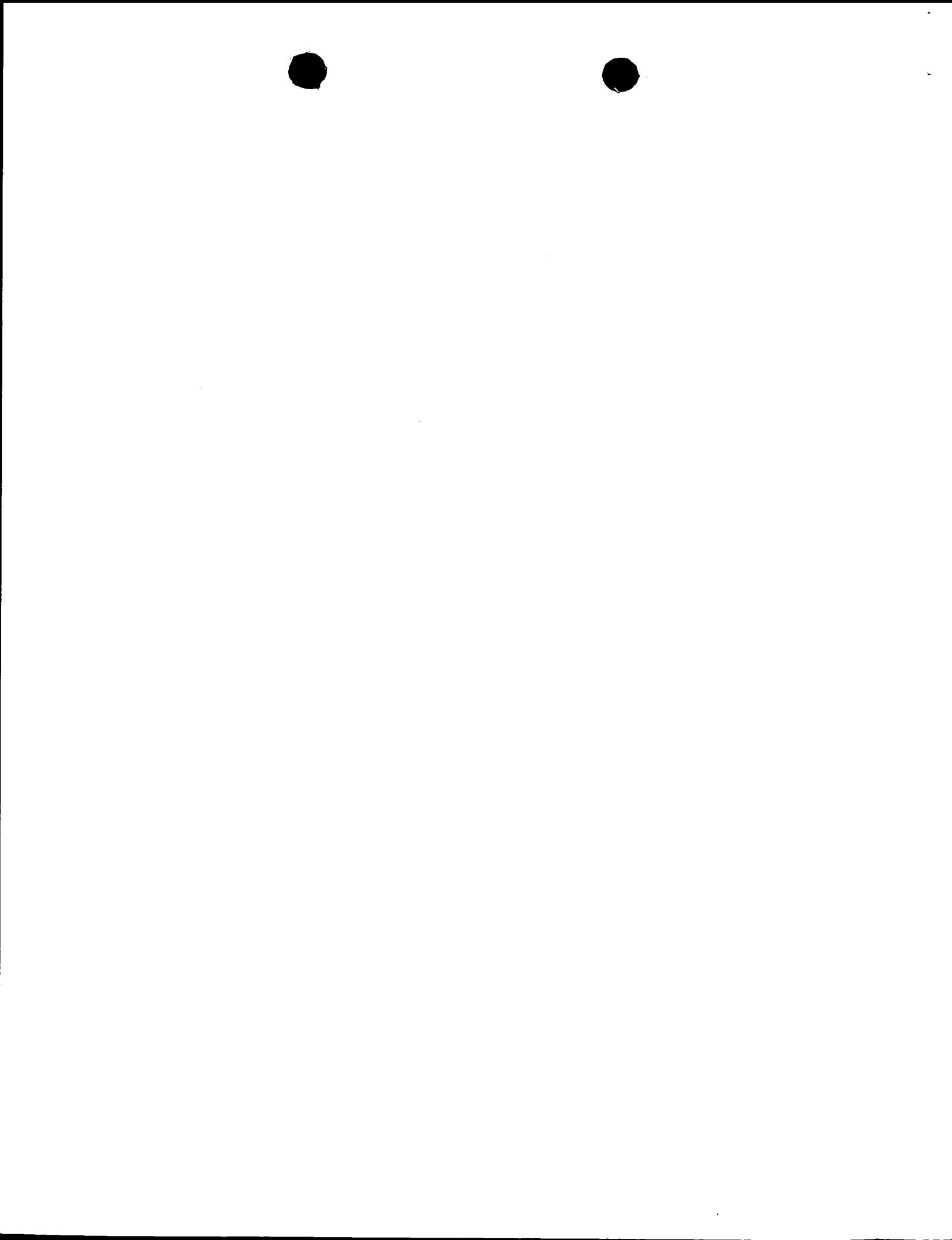
 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01747

II. Priority

1. This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
 - copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

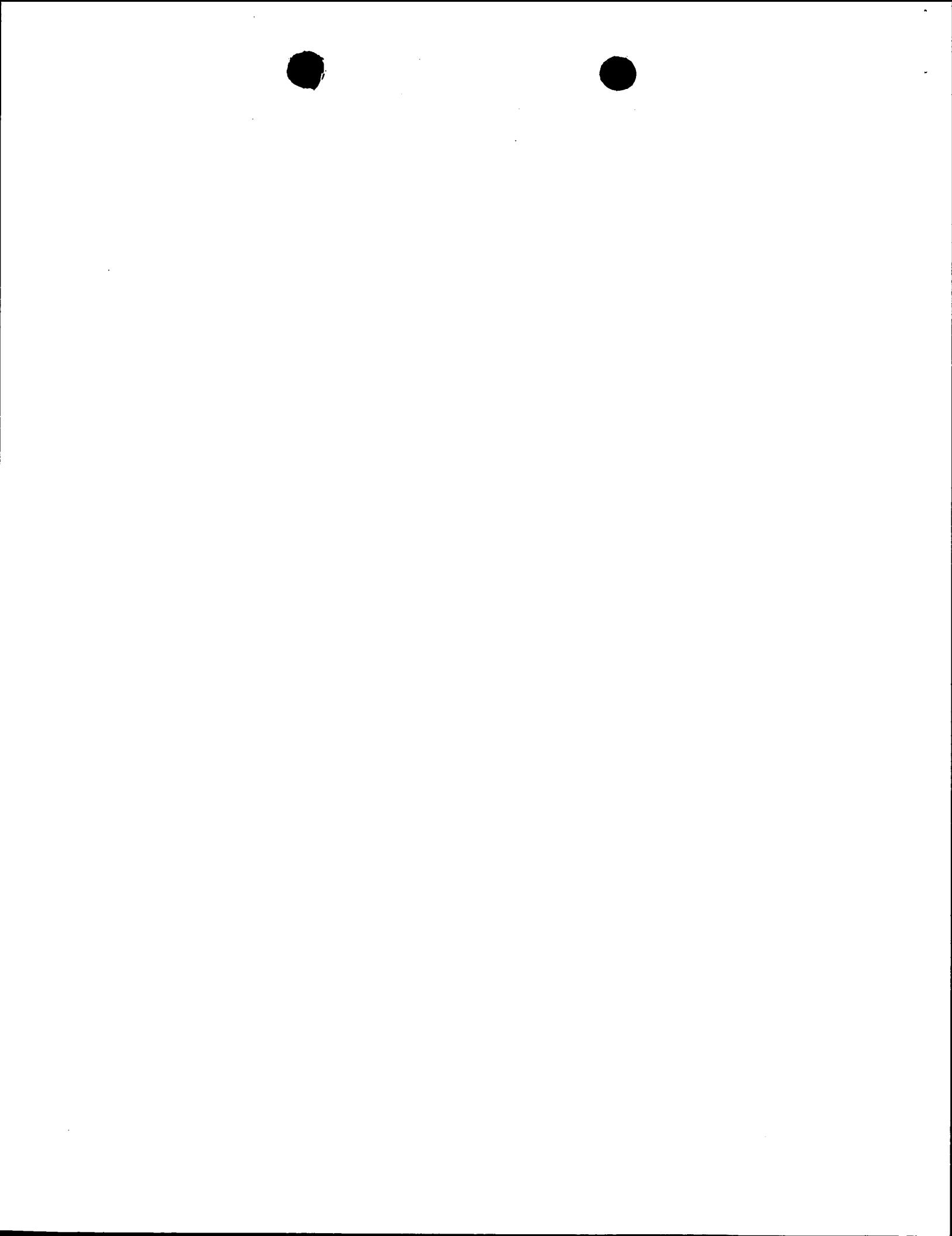
3. Additional observations, if necessary:**SEE SEPARATE SHEET**



Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3

1. The present application claims the priority of application FR 99/07935 (P1) filed on 22 June 1999. The sequence SEQ ID NO. 12 claimed is not disclosed in P1. Therefore, the priority date of P1 cannot be recognised for said sequence, and only the filing date of the present application is valid for the assessment of the subject matter of those claims that refer to said sequence. Since documents D10 and D11 were published before the filing date of the present application, they can be considered to be part of the prior art relevant to the subject matter of the application that is not covered by the priority date of P1.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01747

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 31-35,37,39

because:

the said international application, or the said claims Nos. 39 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

SEE SEPARATE SHEET

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 31-35,37 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

SEE SEPARATE SHEET

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.1

1. No opinion has been formed in part on the basis of the subject matter of **claim 31** and the claims that refer thereto, in so far as they do not relate to the antibodies or polynucleotides claimed in the application. The ligand of claim 31 is defined solely in terms of the method for preparing same, meaning that said ligand remains completely undefined and no real technical feature can be derived from the subject matter of claim 31 with a view to determining the nature of said ligand, except for the antibodies and polynucleotides claimed. Therefore, no opinion has been formed on the basis of said parts of the claims.

2. The present Authority considers that the subject matter of **claim 39** is covered by the provisions of PCT Rule 67.1(iv). For this reason, no opinion will be given on the question of whether the subject matter of these claims is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01747

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

SEE SEPARATE SHEET

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

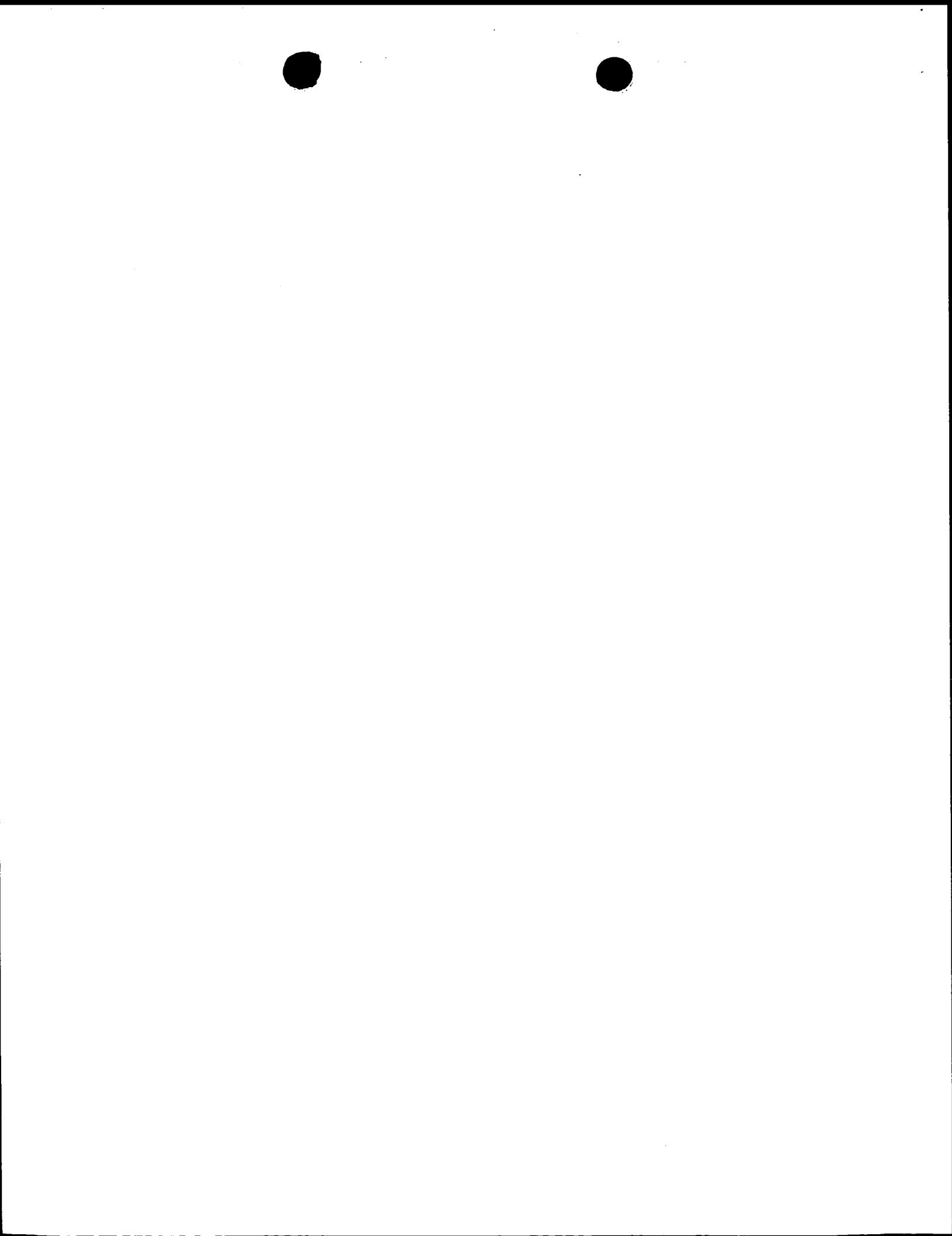


Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

1. The priority date of P1 is not valid for the sequence SEQ ID NO 12, and only the filing date of the present application has been taken into account. Documents D10 and D11 are therefore considered to be part of the prior art relevant to the subject matter that relates to said sequence (see Box II). The subject matter of claims 12 and 13, to which claim 14 refers, was not novel on the filing date of the present application over D10 and D11, which disclose vectors having all of the technical features mentioned in claims 12 and 13 (e.g. D10, pages 122 and 124; D11, page 3, line 4, page 14, line 10, page 16). It follows that the subject matter of claim 14 and that of the claims that refer thereto do not constitute a single inventive concept, as defined in PCT Rule 13, together with the rest of the subject matter claimed in the application. Therefore, claim 14 and the subject matter dependent thereon constitute a separate invention from the rest of the subject matter claimed.



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 5, 6, 11, 19, 20, 28-30, 36, 37, YES 39
	Claims	2-4, 7-10, 12-18, 21-27, 31-35, NO 38
Inventive step (IS)	Claims	YES
	Claims	1-39
Industrial applicability (IA)	Claims	1-38
	Claims	NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 August 1998 (1998-08-18), HINXTON, GB

D2: DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 April 1997 (1997-04-18), HINXTON, GB

D3: FUJIMORI A. ET AL.: 'Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation', MAMMALIAN GENOME, vol. 9, no. 12, 1998, page 1032-1035

D4: WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID; IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 August 1998 (1998-08-27)

D5: SANDRI M I ET AL.: 'P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE' NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 22, 15 November 1996 (1996-11-15), pages 4464-4470, cited in the application

D6: ISAACS RJ T AL.: 'Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence arrested cells', THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 July 1996 (1996-07-12), pages 16741-16747, cited in the application



D7: HERZOG C E AND ZWELLING L A: 'Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase IIalpha promoter'

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH

COMMUNICATIONS, vol. 232, 1997, pages 608-612, cited in the application

D8: LIM K ET AL.: 'Reduced level of ATF is corelated with transcriptional repression of DNA topoisomerase IIalpha gene during TPA-induced differentiation of HL-60 cells' BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 1, September 1998 (1998-09), pages 35-42, cited in the application

D9: KUBO T ET AL.: 'DNA topoisomerase IIalpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells', CANCER RESEARCH, vol. 55, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 3860-3864, cited in the application

D10: HOPFNER R ET AL.: 'ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression', CANCER RESEARCH, vol. 60(1), 1 January 2000 (2000-01-01), pages 121-8.

D11: WO 99 38972 A (CRKVENJAKOV RADOMIR; JONES WILLIAM LEE (US); STACHE CRAIN BIRJIT () 5 August 1999 (1999-08-05)

The sequence comparisons are known to the applicant.

Introduction

The application discloses a human polypeptide ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein 90) that binds to a CCAAT box, a recombinant vector



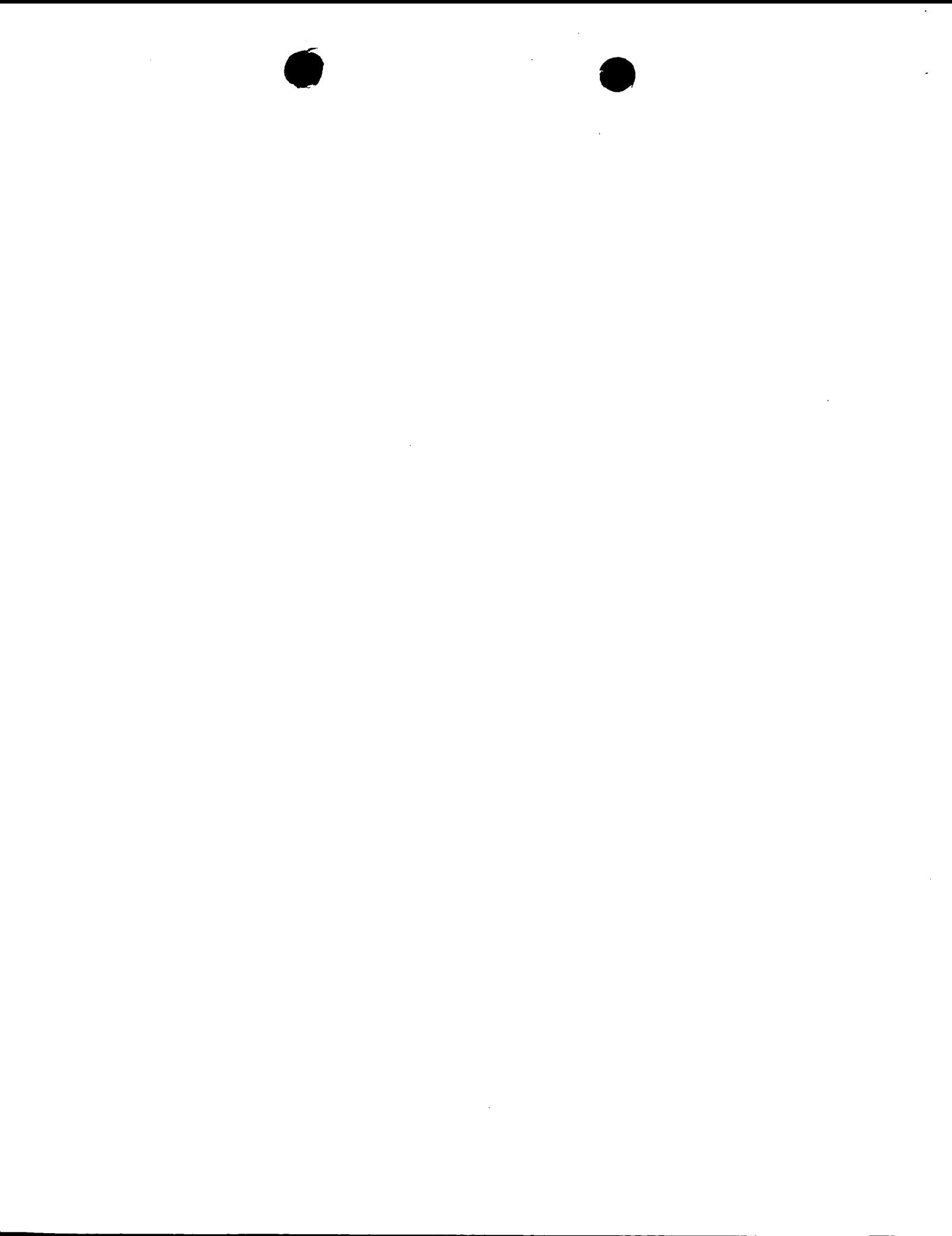
containing a polynucleotide encoding said polypeptide, a host cell transformed by said vector, an antibody that binds specifically to said polypeptide, as well as the use thereof, particularly for treating cell proliferation and/or cancer.

Novelty and inventive step (PCT Article 33(1) to (3))

1. A plurality of the criteria used to define the invention are unclear and fail to comply with PCT Article 6. As a result, objections are raised regarding the novelty and inventiveness of the subject matter claimed (see Box VIII):
2. **Claims 2-4, 7-10, 12, 13, 15-18, 21-27, 31-35 and 38** are not novel over D3. D3 discloses cloning of a gene which encodes a mouse nuclear protein (Np95) associated with cell proliferation and abnormally expressed in lymphoma cells (see, e.g., the abstract, pages 1032 and 1034). The sequence of Np95 is 73.4 % identical (85 % similar) to the sequence SEQ ID NO. 2 of the present application over the full length thereof (see the sequence comparisons on page 9). Np95 comprises at least one DNA binding domain (see, e.g., the abstract, page 1034). D3 also discloses primers for nucleic sequence amplification, vectors (especially expression vectors) containing Np95 sequences, host cells containing said vectors, antibodies to Np95, detection and/or assay methods, and kits for carrying out said methods (see, e.g., the abstract, pages 1032-1035).



3. **Claims 3, 7, 12, 15 and 17** are ~~not~~ novel over D1 and D2. D1 discloses an EST (Expressed Sequence Tag) EMBL:AI084125 that is 99.7 % identical over 326 nucleotides containing a "leucine zipper" unit (see also the sequence comparisons on pages 2 and 3). D2 discloses an EST EMBL:AA354253 that is 98.3 % identical over 350 nucleotides (see also the sequence comparisons on pages 4 and 5).
4. **Claim 14** is not novel. Since document D11 can be taken into consideration for the subject matter of claim 14 (see Box II), a person skilled in the art would necessarily arrive at the promoter starting with the cDNA disclosed in D11 (and matching sequence SEQ ID NO. 944 on pages 153 and 220, and the sequence comparisons on page 8) and using the methods described in D11 (see, e.g., page 8, lines 22-30 and page 10 ff.).
5. The subject matter of claims **1, 5, 6 and 28-30** is novel but not inventive in the light, e.g., of D3. A person skilled in the art aware of the existence in rats of a gene homologous to gene np95 of D3 (page 1034, left-hand column, second paragraph, page 1035, left-hand column, first paragraph) would have used the mouse gene to obtain the homologous gene in other mammalian species, particularly humans, without having to exercise inventive skill, and would thus have arrived at the invention according to the application. Although there are differences involving the transcriptional expression of genes np95 and ICBP90 and structural differences involving the presence of an ATP/GTP binding domain present only in protein np95, the comparison of mouse gene Np95 disclosed in D3 with

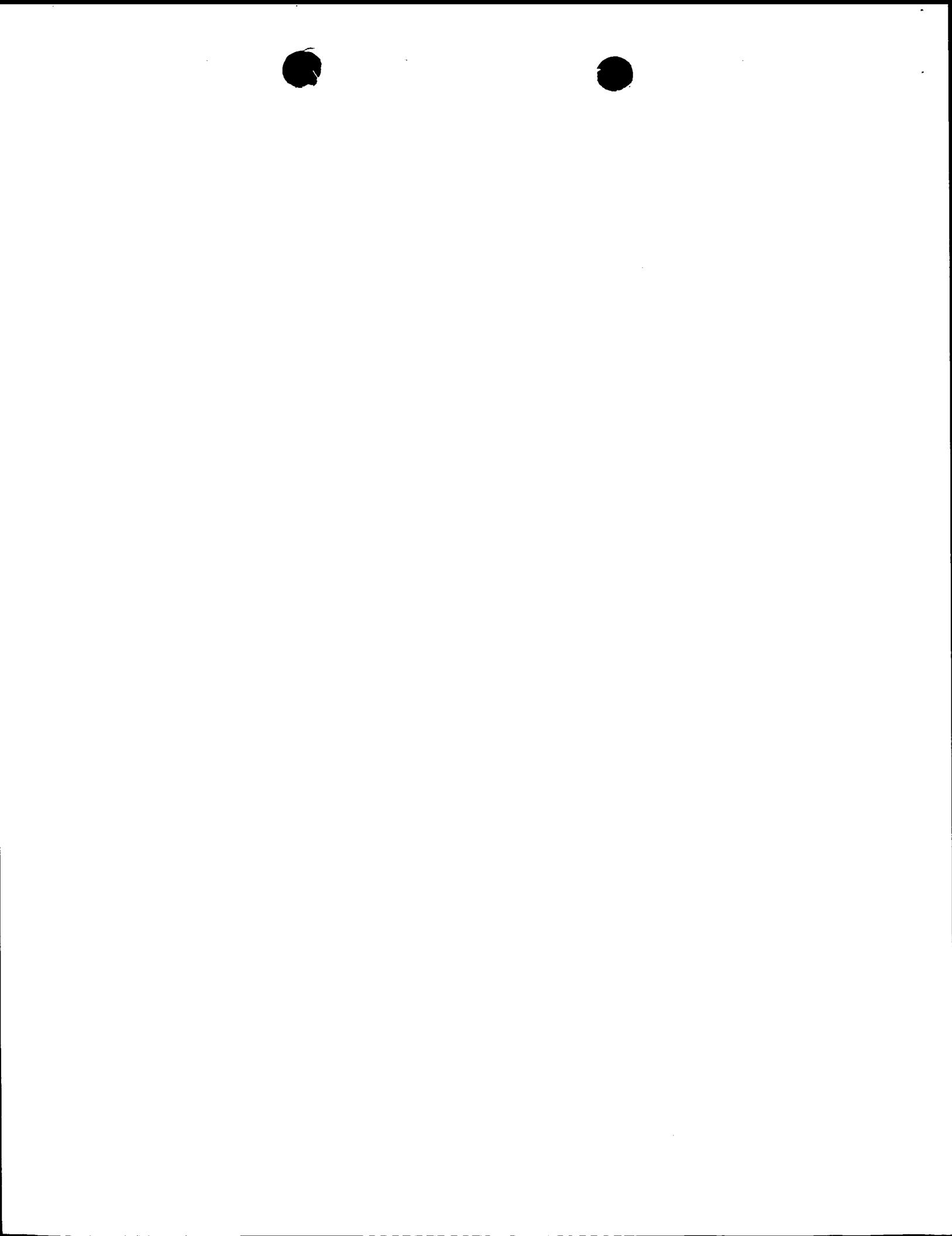


the gene of the present application shows that, in addition to the high degree of similarity (85 %) in the protein sequence (see point 2), there is a match between the structural domains, particularly as a result of the presence of a DNA binding "zinc finger" domain which suggests that np95 is also a transcription factor. The expression characteristics of mouse gene np95 and human gene ICBP90 partially overlap and the two proteins are involved in cell proliferation. The common characteristics of Np95 and ICBP90 strongly suggest overall that mouse gene np95 is homologous to the human gene disclosed in the present application.

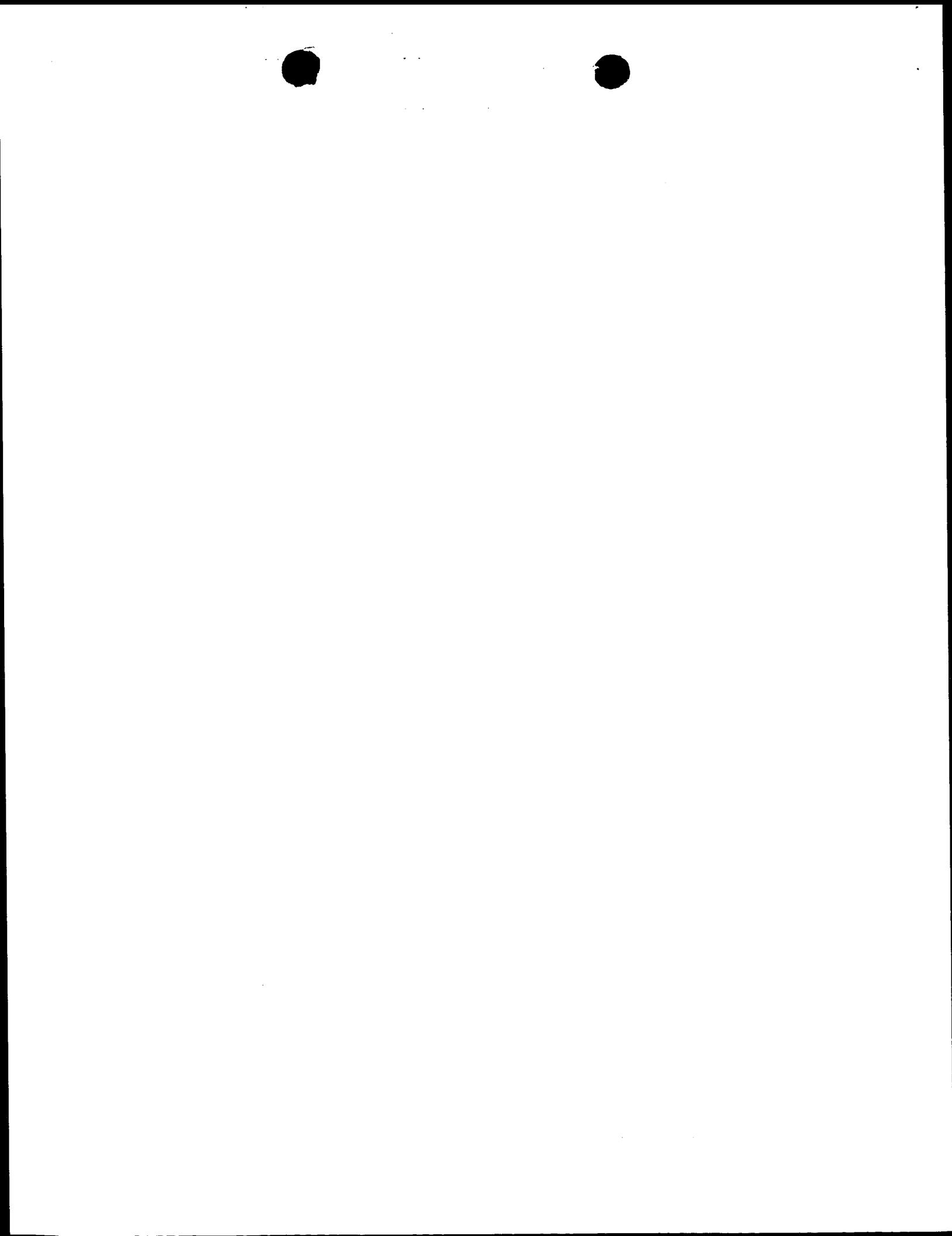
6. The subject matter of **claims 11, 19, 20, 36, 37 and 39** is obvious from D3 in combination, e.g., with D4. The subject matter of claims 19 and 20 is not inventive because a person skilled in the art would have considered producing antibodies to a known protein. Given the teaching of D3 and D4, combining all of the features set forth in claim 11 is a routine technical measure for a person skilled in the art to take. It follows that the subject matter of said claims does not involve an inventive step.

Industrial applicability (PCT Article 33(1) and (4))

7. There are no uniform criteria in the PCT Contracting States for determining whether **claim 39** is industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the subject matter of use claims relating to the medical use of a compound to be



industrially applicable. However, claims relating to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims relating to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.

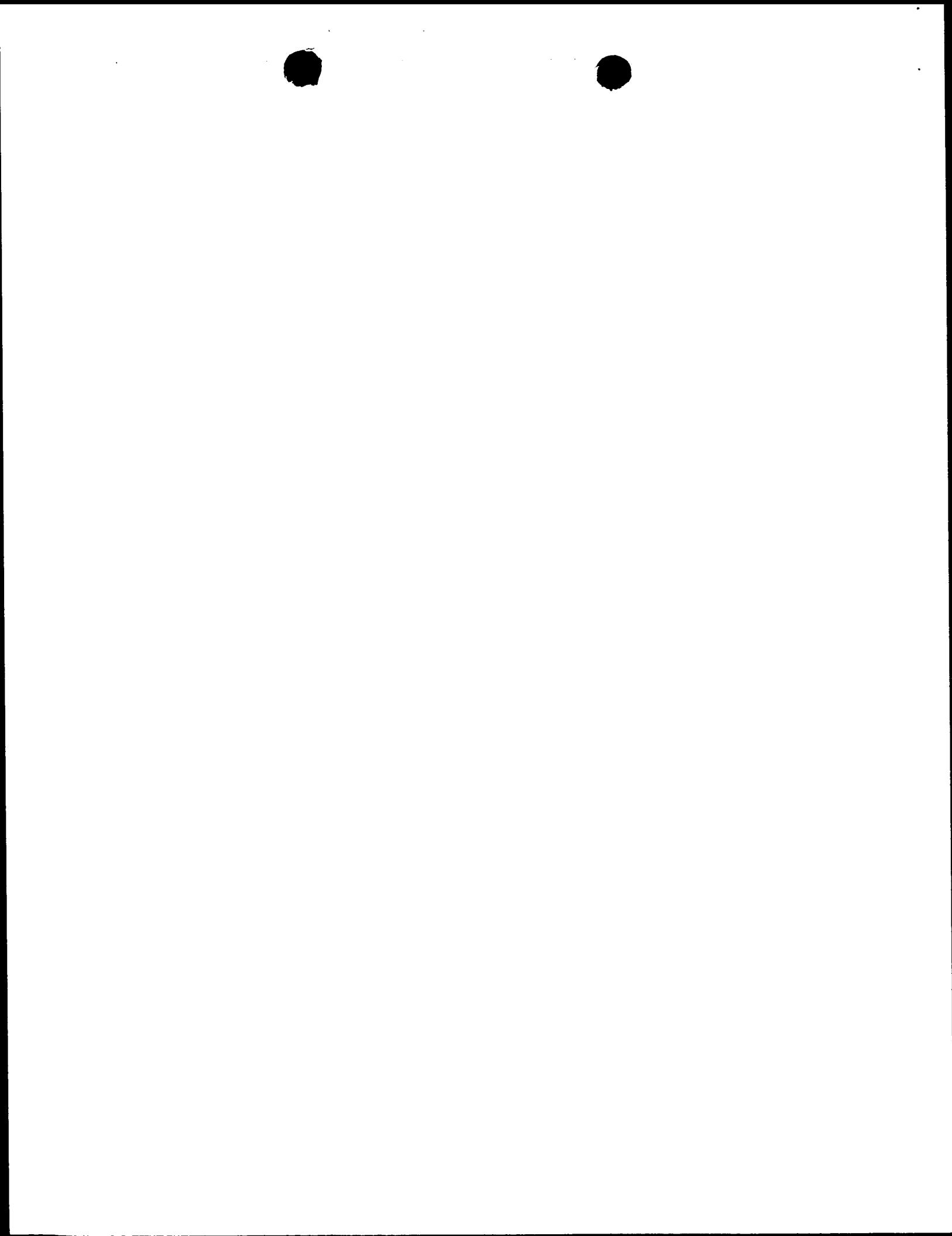


Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.

The applicant's attention is drawn to the fact that D11 is considered to be part of the prior art in some PCT Contracting States. For example, the EPO considers that D11 is prejudicial to the novelty of the subject matter of the present application (EPC Article 54(3) and (4)) as far as the same designated PCT Contracting States are concerned.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

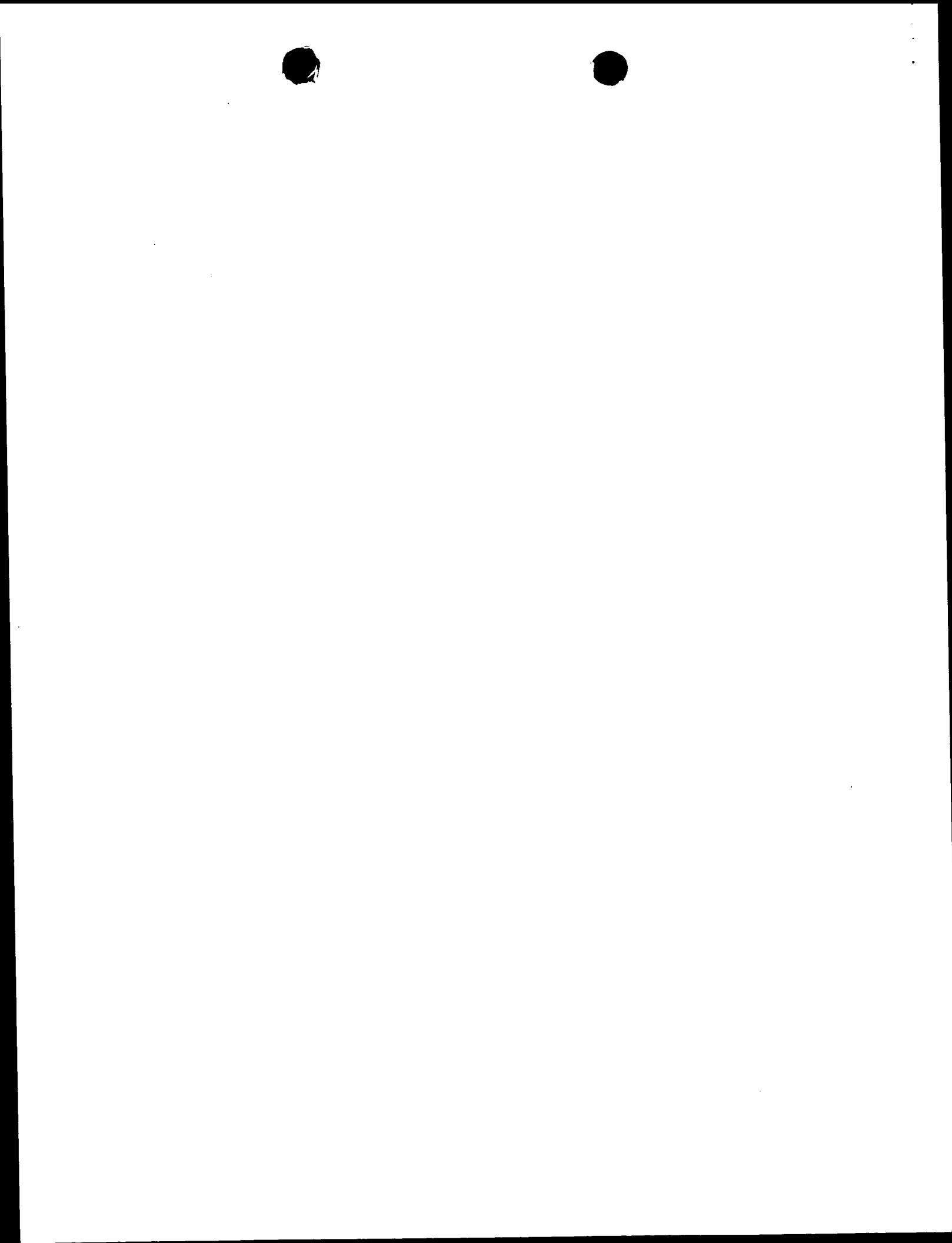
The following observations are made regarding the clarity of the subject matter claimed (PCT Article 6):

1. The term "variant", when used with reference to a protein or a nucleic acid (e.g. as in claim 1) does not clearly define said products and it is not possible to determine what compounds are covered by the scope of said claims.
2. The claims (e.g. 2 and 7) that refer to "homologous" sequences or sequences having a given percentage of "homology" include, in the light of the description, any sequence having any degree of similarity. Furthermore, "% of homology" is meaningless. Homologous sequences are sequences that have the same origin and may not be identical.
3. Since the length of the polynucleotide or polypeptide sequences is not always specified (e.g. in claims 2, 7 and 14), sequences of 2 nucleotides or 2 amino acids, respectively, are covered by the scope of said claims.
4. Since the hybridisation conditions are insufficiently specified (e.g. on page 14, lines 5-11 of the description) for the polynucleotides claimed (e.g. in claims 7 and 14), it is impossible to determine what sequences are covered by said claims under these conditions.
5. The expression "biologically active", when used with



VIII. Certain observations on the international application

reference to a fragment, does not enable the length of said fragment to be determined (see, e.g., claim 2) because, in a suitable context, a single amino acid can impart a biological activity.



“ POLYPEPTIDE ICBP90 ET SES FRAGMENTS ET
POLYNUCLEOTIDES CODANT LESDITS POLYPEPTIDES ET
APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET AU TRAITEMENT DU
CANCER ».

5 La présente invention concerne un nouveau polypeptide ICBP90 et ses fragments, le clonage de l'ADNc et les polynucléotides codant pour lesdits polypeptides, des vecteurs de clonage et/ou d'expression incluant lesdits polynucléotides, des cellules transformées par lesdits vecteurs et des anticorps spécifiques

10 dirigés contre lesdits polypeptides. L'invention concerne également des procédés et des kits de diagnostic des cancers, un procédé et un kit de criblage de ligands du polypeptide de l'invention et des composés utilisables à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

15 Les ADN topoisomérases sont des protéines nucléaires hautement conservées au cours l'évolution dont le rôle principal est de contrôler la conformation et la topologie de l'ADN dans le noyau, qui sont constamment altérées par les différents processus biologiques impliquant l'ADN tels par exemple la transcription et la

20 réPLICATION. Les topoisomérases exercent leur action en coupant l'ADN et en reliant ces lésions après avoir réalisé le changement conformationnel adéquat.

 Chez les mammifères et l'homme en particulier, il existe à l'heure actuelle au moins cinq gènes différents codant pour une topoisomérase et au moins deux pseudogènes additionnels (pour revue, voir Nitiss 1998). Ainsi, la topoisomérase I, codée par le gène TOP1 retire les supertours présents dans l'ADN en ne coupant qu'un seul brin. Les deux topoisomérases de type II existant chez l'homme appelées TopII α et TopII β , altèrent la topologie de l'ADN en introduisant des clivages double brin transitoires (pour revue, voir

Wang 1996). Enfin, il existe deux topoisomérases de type III codées par deux gènes localisés en 17p11.2-12 et 22q11-12 et qui agissent uniquement contre les supertours négatifs de l'ADN.

Dans les cellules tumorales, les topoisomérases de type II jouent un rôle très important ; dans ces cellules en croissance et en division rapide, il existe un grand besoin de maintenir les molécules d'ADN dans une conformation correcte puisque des taux de transcription et de réplication élevés sont nécessaires. Ainsi, les taux de topoisomérases II sont en général plus élevés dans les cellules tumorales humaines que dans les tissus normaux de même origine. Cependant, le taux d'expression élevé de la topoisomérase II α dans les cellules tumorales peut varier entre deux tumeurs de nature différente affectant un même tissu. Par exemple, le noyau des cellules de carcinome du poumon à petites cellules présente un taux plus élevé de topoisomérase II α que le noyau des cellules de carcinomes pulmonaires à cellules de taille normale (Guiney *et al.*, 1996). De la même manière, le taux de topoisomérase II α dans les cellules A549 est trois fois plus élevé que dans les cellules PC3, ces deux lignées cellulaires provenant d'adénocarcinome de l'épithélium pulmonaire (Yamasaki *et al.*, 1996).

Ces constatations donnent à penser que la topoisomérase II α peut être considérée comme un marqueur de prolifération cellulaire pour certains types de cancer. Le processus cancéreux se caractérisant par une prolifération cellulaire anormale due en partie à la perte de l'inhibition de contact, la topoisomérase II α apparaît donc comme une cible privilégiée des drogues chimiothérapeutiques pour le traitement du cancer (Pommier *et al.* 1994), et les traitements anticancéreux actuels font largement appel aux inhibiteurs de topoisomérases.

La plupart de ces inhibiteurs exercent leurs effets cytotoxiques en stabilisant le complexe de clivage de l'ADN. Des drogues comme les anthracyclines (doxorubicine (adriamycine) ou épipodophyllotoxines (tel l'étoposide (VP-16) ou le tétriposide 5 (VM26))), les acridines (tel que le mAMSA) et les anthracendiones (e.g. mitoxantrone) sont des exemples de drogues inhibitrices de topoisomérases II qui stabilisent le complexe de clivage. Plus récemment, une nouvelle classe d'inhibiteurs de topoisomérases II a été développée ; ces inhibiteurs agissent au niveau de l'activité 10 catalytique et non plus en stabilisant le complexe de clivage. La drogue fostriécine en est un exemple (Boritzki *et al.*, 1988). Aujourd'hui ces différentes drogues sont utilisées dans des traitements anti-cancéreux curatifs et palliatifs.

Néanmoins, l'un des problèmes majeurs rencontré dans les 15 traitements anti-cancéreux actuels utilisant les inhibiteurs des topoisomérases est l'émergence d'une résistance aux drogues (Kubo *et al.*, 1995). Ces résistances sont soit le fait d'une surexpression de pompes permettant l'efflux de drogues à l'extérieur de cellules avant qu'elles n'atteignent leur cible (e.g. P-glycoprotéine, protéine 20 associée à la multirésistance aux drogues (MRP)), soit le fait de changement du taux d'expression de la topoisomérase II α (Deffie *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1991), soit des deux (pour revue, voir Isaacs *et al.*, 1998).

L'un des aspects de la présente invention est donc de 25 comprendre les mécanismes de régulation de l'expression du gène de la topoisomérase II α , afin de développer une alternative au phénomène de résistance aux drogues observé pour certains cancers, et ce, dans l'optique d'améliorer le traitement préventif et curatif des cancers.

Il existe deux types de topoisomérases de type II qui diffèrent dans leur profil d'expression ; la topoisomérase II α (Top II α) (170 kD), essentiellement localisée dans le nucléoplasme au niveau du centromère des chromosomes mitotiques, intervient dans les processus biologiques fondamentaux que sont la réplication, la condensation des chromosomes et la transcription. La topoisomérase II β (Top II β) (180 kD) est semble-t-il plutôt impliquée dans la transcription des ARN ribosomiques étant donné la localisation nucléolaire de cette enzyme. Les deux topoisomérases de type II humaines sont localisées sur deux chromosomes différents (17q21-22 pour la topoisomérase II α et 3p24 pour la topoisomérase II β) (Tsai-Plugfelder *et al.*, 1988 ; Drake *et al.*, 1989 ; Chung *et al.*, 1989 ; Jenkins *et al.*, 1992 ; Austin *et al.*, 1993).

Contrairement à la topoisomérase II β dont l'expression se caractérise par une relative constance, la topoisomérase II α présente une variation d'expression en fonction de l'état de prolifération des cellules et de leur position dans le cycle cellulaire. L'expression de l'ARN messager (ARNm) est plus élevée dans les cellules en prolifération que dans les cellules arrêtées en confluence. L'expression de la topoisomérase II α augmente au cours de la phase S du cycle cellulaire pour atteindre un maximum en fin de phase G2/M (Goswami *et al.*, 1996), le niveau d'ARN messager étant dix fois plus élevé en fin de phase S que pendant la phase G1. Egalement, il semble exister un couplage entre la synthèse et la dégradation de la topoisomérase II α et la condensation/décondensation chromosomique (Heck *et al.*, 1988).

Les connaissances actuelles concernant la régulation du gène de la topoisomérase II α restent somme toute assez sommaires. Récemment, une région promotrice d'environ 650 paires de bases a

étée décrite par Hochhauser *et al.* (1992), elle présente toutes les caractéristiques d'un gène domestique, absence de boîte TATA et richesse modérée en sites GC (présence notamment d'une boîte Sp1 pouvant remplacer la boîte TATA) en sont deux exemples. La 5 présence de 5 boîtes CCAAT inversées ou ICB (Inverted CCAAT box) est une autre particularité de ce type de promoteur.

Des facteurs de transcription interagissant avec le promoteur du gène de la topoisomérase II α humaine ont été décrits ; on peut citer c-myb (Brandt *et al.*, 1997), p53 (Sandri *et al.*, 10 1996), ATF (Lim *et al.*, 1998), Sp1 et Sp3 (Kubo *et al.*, 1995). Quoi qu'il en soit, en dehors de NF-Y (également appelé CBF, ACF et CP1, références dans Isaacs *et al.*, 1996) les facteurs de transcription agissant sur les séquences ICB du promoteur du gène de la topoisomérase II α humaine ne sont pas encore tous identifiés 15 et caractérisés ; Herzog et Zwelling (1997) ont cependant mis en évidence deux protéines d'un poids moléculaire apparent de 90 kD et de 140 kD qui lient respectivement ICB1 à ICB4 et ICB5. Isaacs et ses collaborateurs (1996) ont proposé que le NFY ainsi qu'une autre protéine non identifiée reconnaissent une boîte ICB de la 20 région promotrice du gène de la topoisomérase II α ; ils ont également montré que les mutations de ICB2 abrogeaient complètement la diminution de l'activité promotrice normalement observée dans des cellules arrêtées à confluence (Isaac *et al.*, 1996). Ils ont identifié NFY comme un composant d'un complexe induit 25 par la prolifération et qui se lie *in vitro* à la séquence ICB2 du promoteur du gène de la topoisomérase II α humaine, bien que NF-Y soit toujours détectable dans les cellules arrêtées à confluence (Isaac *et al.*, 1996). Ils ont proposé que ICB2 agisse comme un régulateur négatif du promoteur du gène de la topoisomérase II α 30 des cellules arrêtées à confluence et que cette répression puisse

être supprimée dans les cellules prolifératives. La boîte ICB2 du promoteur du gène de la topoisomérase II α joue donc un rôle primordial dans l'arrêt du processus prolifératif normal lorsque les cellules arrivent à confluence.

5 Des facteurs de transcription se liant à la séquence ICB ainsi que la séquence ICB elle-même constituent donc des cibles moléculaires pour contrôler le taux d'expression de la topoisomérase II α . En intervenant sur ces facteurs, il est possible d'envisager de contrôler l'expression du gène de la topoisomérase
10 II α et par voie de conséquence la prolifération cellulaire.

La présente invention a pour objet la mise en évidence de nouveaux facteurs de transcription se liant la boîte ICB impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Une technique récente appelée système « simple-hybrid »
15 qui permet d'isoler des clones ADNc codant pour des protéines de liaison à l'ADN spécifique de certaines séquences a été utilisée. Ce système présente un double avantage car il est capable non seulement de mettre à jour des interactions ADN-protéine *in vivo* chez la levure mais aussi de donner directement accès aux ADN
20 complémentaires (ADNc) codant les protéines candidates ayant une activité de facteur transcription. Le système repose principalement sur la construction d'une souche de levure test selon le principe mis au point par Wang et Reed (1993). Cette souche de levure permet le criblage de banques d'ADNc en mettant en évidence
25 l'interaction ADN-protéine *in vivo* par le biais de l'activation d'un gène rapporteur intégré au génome de la levure test.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé dénommé ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein) de
30 séquence d'acides aminés SEQ ID N°2. Cette séquence comprend :

- a) un domaine « ubiquitine » comprenant la séquence d'acides aminés 1 à 75 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- 5 b) un domaine « doigt de zinc » de type C4HC3 comprenant la séquence d'acides aminés 310 à 366 de la séquence SEQ ID N°2 et un domaine "doigt de zinc" de type C3HC4 comprenant la séquence d'acides aminés 724 à 763 de la séquence ID n° 2;
- 10 c) un domaine « leucine zipper » putatif comprenant la séquence d'acides aminés 58 à 80 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- d) deux domaines de localisation nucléaire potentiels comprenant les séquences d'acides aminés 581 à 600 et 648 à 670 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- 15 e) un site de phosphorylation par une tyrosine kinase comprenant la séquence d'acides aminés 452 à 458 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- f) des sites de phosphorylation par une protéine kinase cAMP/cGMP dépendante comprenant les séquences d'acides aminés 246 à 249, 295 à 298 et 648 à 651 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- 20 g) des sites de phosphorylation par une caséine kinase II comprenant la séquence d'acides aminés 23 à 26, 57 à 60, 91 à 94, 109 à 112, 165 à 168, 265 à 268, 354 à 357 et 669 à 672 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- 25 h) des sites de phosphorylation par une protéine kinase C comprenant la séquence d'acides aminés 82 à 84, 104 à 106, 160 à 162, 173 à 175, 251 à 253, 301 à 303, 380 à 382, 393 à 395, 504 à 506, 529 à 531, 625 à 627 et 639 à 641 de la séquence SEQ ID N°2 .

La présente invention porte également sur un polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 ;
- 5 b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ;
- c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b) et comportant au moins 80 % d'homologie, de préférence 90 % avec ledit polypeptide de a) ;
- 10 d) un fragment d'au moins 5 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

Il doit être compris que l'invention concerne les polypeptides obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenues par recombinaison génétique, ou encore par synthèse chimique et pouvant alors comporter des acides aminés non naturels.

Dans la présente description, on utilisera le terme polypeptide pour désigner également une protéine ou un peptide.

On entendra par polypeptide variant l'ensemble des polypeptides mutés pouvant exister naturellement, en particulier chez l'être humain, et qui correspondent notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions de résidus 25 d'amino-acides. Les polypeptides homologues selon l'invention conserve au moins un domaine choisi parmi le domaine de liaison à l'ADN et/ou le domaine d'interaction avec une autre protéine.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport au polypeptide naturel 30 ICBP90, certaines modifications comme en particulier une délétion,

addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncature, un allongement et/ou une fusion chimérique. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80 % d'homologie, de préférence 90 %,

5 de manière préférée 95 %, et de manière encore préférée 97 % d'homologie avec les séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, sont remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé «

10 équivalent » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier les caractéristiques ou propriétés fonctionnelles essentielles, comme leurs activités biologiques, des polypeptides correspondants telles que l'induction *in vivo* d'anticorps capables de

15 reconnaître le polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2, ou l'un de ses fragments ci-dessus définis et notamment la séquence d'acides aminés SEQ ID N°4, SEQ ID N°6 et SEQ ID N°8 . Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur

20 homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'activité biologique croisée auxquels les différents polypeptides sont susceptibles de donner lieu. A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte

25 une modification approfondie des activités biologiques des polypeptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions inverses étant

30 naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Par fragment biologiquement actif, on entendra désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention présentant au moins une des caractéristiques ou propriétés fonctionnelles des polypeptides selon l'invention,

5 notamment en ce que : (i) il est capable d'être reconnu par un anticorps spécifique d'un polypeptide selon l'invention ; (ii) il présente au moins l'un des domaines ou régions tels que définis ci-après ; (iii) il est capable de se lier à l'ADN et notamment aux boîtes CCAATT et/ou CCAAT inversée ; (iv) il est capable de moduler

10 le taux d'expression du gène de la topoisomérase II α ; (v) il est capable de moduler la prolifération cellulaire.

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 5 acides aminés, de préférence 7 acides aminés, de manière préférée 10 et de manière encore 15 préférée 15 acides aminés. Les fragments de polypeptide selon l'invention obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, par un réactif chimique, ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide font également partie de l'invention.

20 Le polypeptide selon l'invention peut également s'associer à d'autres polypeptides par des interactions protéine-protéine. On entend désigner par interactions protéine-protéine, des associations mettant directement en contact au moins deux protéines. Ainsi, le polypeptide de l'invention peut se dimériser pour former des 25 homodimères ou des hétérodimères, ou s'associer sous la forme d'homomultimères ou d'hétéromultimères. Le polypeptide selon l'invention peut également interagir avec un autre polypeptide pour exercer son action ; ainsi, le polypeptide selon l'invention peut posséder, en plus de son domaine de liaison à l'ADN, un domaine 30 d'action sur la transcription qui exerce son action via des

interactions protéine-protéine avec d'autres composants protéique de la machinerie transcriptionnelle. On entend désigner par composant protéique de la machinerie transcriptionnelle tous les facteurs de transcription nécessaires à la réalisation et à la 5 régulation de la réaction de transcription.

Le polypeptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est capable de se lier à une séquence d'ADN et en ce qu'il est comporte au moins un domaine de fixation à l'ADN sélectionné dans le groupe composé d'un domaine « doigt de zinc » (zinc-finger) et d'un 10 domaine « leucine zipper » ; la séquence d'ADN sur laquelle se lie ledit polypeptide est une boîte CCAAT, de préférence une une boîte CCAAT inversée (inverted CCAAT box : ICB).

On entend désigner par liaison à une séquence d'ADN, une interaction spécifique entre le polypeptide de l'invention et une 15 séquence d'ADN au moyen d'une série de liaisons faibles contractées entre les acides aminés de la protéine et les bases. Le polypeptide selon l'invention possède au moins un domaine de liaison à l'ADN qui contient au moins un des motifs protéiques connus susceptibles d'interagir avec l'ADN, c'est-à-dire la structure 20 en doigt de gant à laquelle est associée un atome de zinc (« zinc-finger »), la structure hélice-tour-hélice, la structure hélice-boucle-hélice et la fermeture éclair à leucines (« leucine-zipper »).

Par motif en doigt de gant (« zinc-finger »), on entend désigner une séquence d'une vingtaine d'acides aminés ayant dans l'espace 25 une forme de doigt de gant. Il en existe deux types : ceux qui contiennent quatre cystéines (C4) et ceux qui contiennent deux cystéines et deux histidines (C2H2). Ces acides aminés définissent la nature du doigt de gant et sont situés à sa base et un ion Zn⁺⁺ est situé au centre du carré formé par ces quatre acides aminés. Le

polypeptide selon l'invention possède potentiellement deux motifs de type C4.

Par motif de type « leucine zipper », on entend désigner des motifs appartenant à des facteurs de transcription dimérique qui 5 sont soit des homodimères, soit des hétérodimères. Le monomère est constitué d'une séquence à caractère basique qui interagit de manière spécifique avec l'ADN et d'un domaine hydrophobe en hélice α qui interagit avec le domaine homologue de l'autre chaîne. Dans ce domaine se trouve une leucine tous les 7 aminoacides, 10 c'est-à-dire à chaque tour d'hélice. Toutes ces leucines sont alignées et l'interaction se fait à leur niveau entre les deux monomères. Le polypeptide selon l'invention possède potentiellement un motif de type « leucine zipper ».

L'invention concerne également un polynucléotide isolé 15 caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide de séquence SEQ ID N°1 tel que défini précédemment. De manière préférée, le polynucléotide selon l'invention possède la séquence SEQ ID N°1.

L'invention concerne également le polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi : 20

- a) un polynucléotide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ou dont la séquence est celle de l'ARN correspondant à la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ;
- b) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de 25 la séquence d'un polynucléotide défini en a),
- c) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 80% d'homologie avec un polynucléotide défini en a) ou b),
- d) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence de polynucléotide défini en a),

30 b) ou c),

e) un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs, de préférence 21 nucléotides consécutifs, et de manière préférée 30 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini en a), b), c) ou d) à l'exception de l'EST humain AI 084 5 125, à l'exception de la séquence correspondant à la séquence SEQ ID N° 944 publiée le 5 août 1999 dans la demande de brevet WO 99 38972 et à l'exception des séquences SEQ ID N°9, N°10 et N°11 correspondant respectivement aux EST humains N° AI 083 773, N° AA 811 10 055, N° AA 488 755, N° AA 129 794 et N° AA 354 253 présentes dans les bases de données d'EST humains (« human dbest).

Dans la présente description, on entendra désigner par polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, 15 séquence nucléotidique ou acide nucléique un fragment d'ADN, aussi bien un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs, et/ou un fragment d'ARN, lesdits fragments naturels isolés, ou de synthèse, comportant ou non des nucléotides non naturels, désignant un enchaînement 20 précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique.

Par polynucléotide de séquence complémentaire, on entend désigner tout ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la SEQ ID N° 1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7 ou 25 d'une partie de la SEQ ID N° 1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7 et dont l'orientation est inversée.

Par pourcentage d'homologie au sens de la présente invention, on entend un pourcentage d'identité entre les bases de deux polynucléotides, ce pourcentage étant purement statistique et 30 les différences entre les deux polynucléotides étant réparties au

hasard et sur toute leur longueur. Selon l'invention, les polynucléotides de séquence nucléique homologue présentent un taux d'homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de manière préférée 95 %, de manière encore préférée 97 %.

5 Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape 10 d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes :

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes: (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond 15 à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhard's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de 20 taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence 25 décrites ci-avant pour un polynucléotide de taille définie, seront adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook *et al.*, 1989.

Avantageusement, un fragment nucléotidique répondant à la 30 définition précédente aura au moins 15 nucléotides consécutifs, de

préférence au moins 21 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 30 nucléotides consécutifs de la séquence dont il est issu.

Par EST (« expressed sequence tag »), on entend désigner des 5 séquences exprimées, caractérisées dans une banque d'ADN complémentaire (ADNc) et utilisées comme balise cartographique de l'ADN génomique.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le polynucléotide selon l'invention se caractérise en ce qu'il est marqué directement 10 ou indirectement par un composé radioactif ou un composé non radioactif. Utilisation d'un polynucléotide selon l'invention en tant qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques ; l'invention porte également sur l'utilisation d'un polynucléotide selon l'invention en tant que sonde pour la détection 15 de séquences nucléiques. Selon l'invention, les fragments de polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présenteront une taille minimale de 9 bases, de préférence de 18 bases, et de manière plus 20 préférée 36 bases. Enfin, l'invention porte sur l'utilisation d'un polynucléotide selon l'invention en tant que séquence d'acide nucléique sens ou antisens pour contrôler l'expression du produit protéique correspondant.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non 25 marquées peuvent être utilisées directement comme sonde, amorce ou oligonucléotide ; cependant les séquences utilisées sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces, des sondes, des oligonucléotides selon l'invention est réalisé par des 30 éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives ; parmi

les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^{3}H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les 5 agents radioluminescents, chémiluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique PCR (réaction en chaîne à la 10 polymérase)(Erlich, 1989 ; Innis *et al.*, 1990, et Rolfs *et al.*, 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4 683 202. Les fragments amplifiés peuvent être 15 identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée par hybridation moléculaire en utilisant comme sonde les séquences 20 nucléotidiques de polynucléotides de l'invention, des plasmides contenant ces séquences ou leurs produits d'amplification. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique 25 cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les fragments nucléotidiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entendra désigner 5 toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues, en général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon 10 d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription inverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker *et al.*, 1992), la 15 technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh *et al.* en 1989, la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli *et al.* en 1990, la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis *et al.* en 1991, la technique TMA (Transcription 20 Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren *et al.* en 1988 et perfectionnée par Barany *et al.* en 1991, qui emploie une ligase thermostable, la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev en 1992, la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck *et al.* en 25 1990, la technique d'amplification à la Q-béta-réplicase décrite par Miele *et al.* en 1983 et perfectionnée notamment par Chu *et al.* en 1986 et Lizardi *et al.* en 1988, puis par Burg *et al.* ainsi que par Stone *et al.* en 1996.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARN, 30 par exemple un ARNm, on utilisera avantageusement,

préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de 5 l'ARN contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

Les sondes nucléotidiques selon l'invention hybrident spécifiquement avec une molécule d'ADN ou d'ARN de 10 polynucléotide selon l'invention, plus particulièrement avec la séquence SEQ ID N° 1 codant pour le polypeptide ICBP90, dans des conditions d'hybridation de forte stringence telles que données sous forme d'exemple précédemment.

La technique d'hybridation peut être réalisée de manières 15 diverses (Matthews *et al.*, 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tel que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la 20 sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes 25 nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sonde de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite

détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Dans un mode préféré de réalisation, l'invention comprend l'utilisation d'un oligonucléotide sens ou antisens pour contrôler l'expression du produit protéique correspondant. Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression. Les oligonucléotides selon l'invention présentent une taille minimale de 9 bases, de préférence de 18 bases, et de manière plus préférée 36 bases.

L'invention concerne un vecteur recombinant de clonage d'un polynucléotide selon l'invention et/ou d'expression d'un polypeptide selon l'invention caractérisé en ce qu'il contient un polynucléotide selon l'invention tel que précédemment décrit. Le vecteur selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comporte les éléments permettant l'expression éventuellement la sécrétion desdites séquences dans une cellule hôte. Ces vecteurs sont utiles pour transformer des cellules hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques de l'invention. Des vecteurs particuliers sont par exemple des vecteurs d'origine virale ou plasmidique. Parmi ces vecteurs, on préfère ceux de la série pGEX (Pharmacia) pour l'expression dans les bactéries ou pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA USA) pour l'expression en système eucaryote.

Selon un mode particulier de réalisation, le vecteur selon l'invention comporte des éléments de contrôle de l'expression des

polypeptides ; ces éléments de contrôle sont choisis de préférence parmi (i) la séquence promotrice du gène ICBP90 selon l'invention qui correspond à la séquence SEQ ID N°12 ; (ii) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire à la séquence 5 SEQ ID N° 12 ; (iii) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 80% d'identité avec un polynucléotide défini en (i) ou (ii) ; (iv) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence de polynucléotide définie en (i), (ii), (iii). Les outils informatiques à la disposition de l'homme du métier lui 10 permettent aisément d'identifier les boites régulatrices promotrices nécessaires et suffisantes au contrôle de l'expression génique, notamment les boites TATA, CCAAT, GC, ainsi que les séquences régulatrices stimulatrices (« enhancer ») ou inhibitrices (« silencers ») qui contrôlent en CIS l'expression des gènes selon l'invention.

15 Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser les éléments ci-dessus définis et choisis parmi la séquence SEQ ID N°12 pour contrôler l'expression de polypeptides hétérologues autres que ceux de l'invention et notamment pour diriger l'expression de polypeptides hétérologues dans les types cellulaires 20 dans lesquels les polypeptides selon l'invention s'expriment normalement.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par les vecteurs selon l'invention. De 25 préférence, les cellules hôtes sont transformées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant selon l'invention. L'hôte cellulaire peut être choisi parmi les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais également les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en 30 particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et

Aruffo, 1993), mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en œuvre des baculovirus par exemple (Luckow, 1993). Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique 5 insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

L'invention concerne également une méthode de préparation 10 d'un polypeptide caractérisé en ce qu'il met en œuvre un vecteur selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention porte sur une méthode de préparation d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive des cellules transformées selon l'invention dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide 15 recombinant et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Le polypeptide selon l'invention est susceptible d'être obtenu selon un procédé de l'invention et selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. La présente invention concerne donc le polypeptide 20 recombinant susceptible d'être obtenu par la méthode ci-dessus présentée. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur, par 25 exemple d'origine plasmidique ou virale, et d'une cellule hôte compatible. Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule et peut éventuellement 30 posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion du

polypeptide traduit. Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standards telles par exemple la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation, le choc thermique.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondant auxdits polypeptides recombinants, sont également compris dans l'invention. Les peptides selon l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

Les procédés de purification de polypeptide recombinant utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immuno-affinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques, etc.

Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine « porteuse » (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit 5 recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

L'invention concerne également un anticorps monoclonal ou 10 polyclonal et ses fragments, caractérisés en ce qu'ils lient spécifiquement un polypeptide selon l'invention. Les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et les anticorps simple chaîne font également partie de l'invention. Les fragments d'anticorps selon l'invention sont de préférence des fragments Fab 15 ou F(ab')2.

Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 20 1975. Les inventeurs ont employé cette technique pour obtenir un hybridome produisant un nouvel anticorps monoclonal hautement spécifique d'un épitope de la protéine ICBP90.

Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple 25 par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent 30 aussi être préparés par purification sur une colonne d'affinité, sur

laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention.

L'invention porte également sur un anticorps monoclonal spécifique de la protéine ICBP90 humaine et capable d'inhiber 5 l'interaction entre ICBP90 et la séquence d'ADN sur laquelle se lie spécifiquement la protéine ICBP90. Selon un autre mode de réalisation, l'anticorps monoclonal selon l'invention et spécifique de la protéine ICBP90 humaine est capable d'inhiber l'interaction entre ICBP90 et les protéines avec lesquelles ICBP90 interagit, lesdites 10 protéines étant de préférence ICBP90 elle-même ou des protéines du complexe transcriptionnel. Par protéines du complexe transcriptionnel, on entend désigner toutes les protéines intervenant dans la réaction de la transcription que se soit l'initiation, l'elongation ou la terminaison de la transcription.

15 Les anticorps de l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention et de manière préférée avec un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des 20 polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse de l'expression de 25 polypeptide selon l'invention, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immunoconjugués enzymatiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention doit être observée, et plus particulièrement en immunocytochimie, en

immunohistochimie ou dans des expériences de « western blotting ».

Ainsi, l'invention concerne une méthode de détection et/ou de dosage d'un polypeptide selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes de mise en contact de l'échantillon biologique avec des anticorps selon l'invention puis de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé. Cette méthode peut être utilisée en immunocytochimie pour la localisation cellulaire du polypeptide selon l'invention et en immunohistochimie pour évaluer la prolifération cellulaire.

Entre également dans le cadre de l'invention, un nécessaire pour la détection et/ou le dosage d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un anticorps monoclonal ou polyclonal tel que décrit précédemment ; (ii) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ; (iii) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique. Ce kit est notamment utile à la réalisation d'expériences de Western Blotting ; celles-ci permettent d'étudier la régulation de l'expression du polypeptide selon l'invention à partir de tissus ou de cellules. Ce kit est également utile aux expériences d'immunoprécipitation pour mettre en évidence notamment les protéines interagissant avec le polypeptide selon l'invention.

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection et/ou dosage. A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-30 immunologique (RIA) ou équivalent.

L'invention comprend également une méthode de détection et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) d'isolement de l'ADN à partir de l'échantillon 5 biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ; (ii) d'amplification spécifique de l'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention à l'aide d'amorces ; (iii) d'analyse des produits d'amplification.

L'invention comprend en outre un nécessaire pour la 10 détection et/ou le dosage d'un acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un couple d'amorces nucléiques selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN, et éventuellement (iii) un composant 15 permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde selon l'invention.

L'invention comprend aussi une méthode de détection et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) 20 de mise en contact d'une sonde selon l'invention avec un échantillon biologique ; (ii) de détection et/ou de dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'ADN de l'échantillon biologique.

L'invention comprend également un nécessaire pour la détection et/ou le dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans 25 un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) une sonde selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation, et le cas échéant, (iii) un couple d'amorces selon l'invention, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

L'invention concerne particulièrement les procédés selon l'invention et décrits ci-dessus, pour la détection et le diagnostic de prolifération cellulaire, et plus particulièrement de prolifération cellulaire d'origine cancéreuse.

5 L'invention concerne également une méthode de criblage de ligands susceptibles d'affecter l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le promoteur comporte des boites CCAAT et/ou CCAAT inversées susceptibles de lier un polypeptide selon l'invention, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes
10 suivantes de mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs ligand(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction de transcription ou de détection et/ou de mesure de l'activité transcriptionnelle. C'est également un des objets de l'invention de fournir un kit ou un nécessaire pour le
15 criblage de ligands susceptibles d'affecter l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le promoteur comporte des boites CCAAT et/ou CCAAT inversées susceptibles de lier un polypeptide selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un polypeptide selon l'invention ; (ii) un ligand ; (iii) les
20 réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction de transcription.

Le polypeptide ICBP90 selon l'invention présente une fonction de récepteur nucléaire. Par récepteur nucléaire, on entend désigner un polypeptide qui possède les propriétés essentielles des
25 récepteurs nucléaires d'hormones. Cette superfamille de gène contient entre autres les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RAR, RXR,...), les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestérone, androgène, œstrogène), et les récepteurs nucléaires aux hormones
30 thyroïdiennes (hormone T3). C'est donc également un des objets de

la présente invention de fournir un procédé de criblage de ligand susceptible d'affecter la fonction « récepteur nucléaire » du polypeptide selon l'invention. Un tel procédé comporte les étapes de :

- 5 a) mise en contact du polypeptide de l'invention et d'un ou plusieurs ligands potentiels en présence de réactifs nécessaires ;
- b) détection et/ou mesure de l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le promoteur comporte des séquences nucléotidiques sur lesquelles sont susceptibles de se lier le polypeptide de l'invention. De préférence, lesdites séquences nucléotidiques sont des boîtes CCAAT et/ou CCAAT inversées (ICB).

Les techniques de détection et/ou de mesure de l'activité transcriptionnelle sont connues de l'homme du métier. Il convient notamment de citer les technologies de Northern Blotting et de RT-PCR qui peuvent être mises en œuvre avec les polynucléotides de l'invention utilisés respectivement comme sonde ou comme amorce.

Par ligand, on entend définir tous les composés susceptibles d'interagir avec le polypeptide selon l'invention pour former un complexe susceptible d'affecter l'activité transcriptionnelle, c'est-à-dire d'augmenter, de diminuer, de moduler ou d'annuler la transcription d'un gène sous le contrôle d'un promoteur contenant une séquence d'ADN à laquelle se lie le polypeptide de l'invention.

Un tel ligand est donc susceptible d'avoir une activité agoniste ou antagoniste. Parmi les ligands selon l'invention, il convient de citer les molécules biologiques interagissant avec le polypeptide selon l'invention, ainsi que tous les composés chimiques de synthèse. Parmi les ligands, il convient également de citer l'anticorps selon l'invention, ainsi qu'un oligonucléotide

présentant une identité de séquence avec la séquence nucléotidique CCAAT et/ou CCAAT inversée ; un tel ligand est susceptible de constituer un inhibiteur du polypeptide selon l'invention.

L'invention porte également sur le ligand susceptible d'être 5 obtenu par les procédés de criblage précédents.

On entend définir également par ligand tout composé susceptible de se lier à la séquence d'ADN de liaison du polypeptide selon l'invention. Un tel ligand constitue un inhibiteur compétitif du polypeptide selon l'invention pour la liaison à la séquence 10 d'ADN.

De préférence, l'échantillon biologique selon l'invention dans lequel est réalisé la détection et le dosage est constitué par un fluide corporel, par exemple un sérum humain ou animal, du sang, de la salive, du mucus pulmonaire, ou par des biopsies. Entre 15 également dans la définition d'un échantillon biologique de l'invention le liquide biologique résultant d'un lavage broncho-alvéolaire obtenu également lors des analyses diagnostiques des cancers des voies aériennes profondes.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un composé 20 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi un anticorps, un polypeptide, un ligand, un polynucléotide, un oligonucléotide ou un vecteur selon l'invention à titre de médicament et notamment en tant que principes actifs de médicament ; ces composés seront préférentiellement sous forme soluble, associés à un véhicule 25 pharmaceutiquement acceptable. Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la préparation de compositions injectables, c'est-à-dire un diluant, un agent de suspension tel une solution saline isotonique ou tamponnée. De 30 préférence, ces composés seront administrés par voie systémique,

en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie orale. Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement 5 d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi un polypeptide, un 10 polynucléotide, un polynucléotide antisens, un anticorps, un vecteur, une cellule, un ligand selon l'invention à titre de médicament et notamment en tant que principes actifs de médicament ; ces composés seront préférentiellement sous forme soluble, associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable. 15 Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la préparation de compositions injectables, c'est-à-dire un diluant, un agent de suspension tel une solution saline isotonique ou tamponnée. De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, 20 en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie orale. Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le 25 poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc. Quand l'agent est un polypeptide, un antagoniste, un ligand, un polynucléotide, par exemple une composition anti-sens, un vecteur, on peut l'introduire dans des tissus ou des cellules hôtes par un certain 30 nombre de façons, incluant l'infection virale, la micro-injection ou

la fusion de vésicules. On peut également utiliser l'injection par jet pour une administration intramusculaire comme décrit par Furth *et al.* (1992). On peut déposer le polynucléotide sur des microparticules d'or, et le délivrer par voie intradermique à l'aide 5 d'un dispositif de bombardement de particules, ou un « pistolet à gène » comme décrit dans la littérature (voir par exemple Tang *et al.* (1992) où les microprojectiles d'or sont revêtues avec le polynucléotide de l'invention, de préférence le polynucléotide antisens de l'invention, puis bombardée dans les cellules de peau.

10 Le composé selon l'invention est utilisé pour la préparation d'un médicament destiné à moduler, à augmenter ou à diminuer la prolifération cellulaire.

L'invention porte également sur une composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif du cancer 15 caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Selon un mode préféré de réalisation, la composition pharmaceutique est caractérisée en ce qu'elle contient un anticorps selon l'invention en tant qu'agent de 20 ciblage conjugué à au moins un agent sélectionné parmi le groupe des agents antiprolifératifs, antinéoplastiques ou cytotoxiques. Ces agents sont des radioisotopes ou des entités non isotopiques. La conjugaison de l'anticorps de la présente invention à un agent antiprolifératif, antinéoplasique ou cytotoxique peut être utilisé 25 pour arrêter le développement des cancers et pour induire une régression et/ou une élimination de la masse tumorale. De préférence, l'anticorps ou le fragment d'anticorps ainsi conjugué est introduit dans le patient atteint de cancer et délivré aux sites tumoraux par voie orale ou parentérale dans un liquide 30 transporteur pharmaceutiquement acceptable tel qu'une solution

de sel physiologique. Alternativement, une solution ou une suspension d'anticorps ou de fragment d'anticorps conjugué à un agent peut être perfusée directement dans le tissu épithéial malin, cette méthode étant utilisée de préférence dans le cas où le cancer 5 n'est pas métastasé.

Les radioisotopes préférés conjugués aux anticorps monoclonaux employés pour la thérapie sont des radioisotopes émetteurs de rayons gamma et de préférence l'Iode¹³¹, l'Yttrium⁹⁰, l'Or¹⁹⁹, le Palladium¹⁰⁰, le Cuivre⁶⁷, le Bismuth²¹⁷ et l'Antimoine²¹¹. 10 Les radioisotopes émetteurs de rayons beta et alpha peuvent également être utilisés pour la thérapie. Les entités non isotopiques conjuguées aux anticorps monoclonaux employés pour la thérapie sont multiples et variés; on peut citer: (i) les antimétabolites telles les agents anti-folate, le méthotrexate, (ii) les analogues des purines 15 et des pyrimidines (mercaptopurine, fluorouracile, 5-azacytidine), (iii) les antibiotiques, (iv) les lectines (ricine, abrine) et (iv) les toxines bactériennes (toxine diphtérique).

L'anticorps selon l'invention peut également être utilisé en tant qu'agent de ciblage pour cibler des cellules cytotoxiques telles 20 les cellules T humaines, les monocytes ou les cellules NK sur le lieu de la tumeur métastasée ou non. Les cellules cytotoxiques peuvent être attachées à l'anticorps via le récepteur Fc situé à la surface de ces cellules ou via un anticorps intermédiaire présentant une double spécificité par exemple; de tels anticorps bispécifiques pour 25 le ciblage des cellules cancéreuses peuvent être produits en fusionnant une cellule immunitaire produisant l'anticorps de la présente invention ou l'hybridome de la présente invention avec une cellule produisant un anticorps dirigé contre la cellule cytotoxique à cibler. Des anticorps bispécifiques peuvent également 30 être produits par couplage chimique de deux anticorps ayant la

spécificité désirée. L'anticorps selon l'invention permet également de cibler des véhicules de délivrance d'agents antiprolifératifs, antinéoplastiques ou cytotoxiques sur le lieu de la tumeur métastasée ou non. Par véhicules de délivrance on entend désigner 5 les liposomes et les particules virales. Dans certains cas, on pourra prévoir des éléments de ciblage assurant une expression spécifique de certains tissus ou cellules de façon à pouvoir limiter les zones d'expression des polypeptides selon l'invention.

L'invention concerne également un produit comprenant au 10 moins un composé selon l'invention et au moins un agent anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie anticancéreuse.

Enfin, l'invention concerne une composition pour la 15 détection, la localisation et l'imagerie des cancers, comprenant un anticorps selon l'invention, tel que l'anticorps est marqué directement ou indirectement avec un marqueur générateur de signal sélectionné parmi les isotopes radioactifs et les entités non isotopiques tels que définis précédemment. L'invention a également 20 pour objet une méthode de détection, de localisation et d'imagerie du cancer, comprenant (i) les étapes d'injection parentérale chez un être humain d'une composition selon l'invention; (ii) l'accumulation après un temps suffisant au niveau des cellules cancéreuses de l'anticorps marqué puis pénétration de l'anticorps marqué à 25 l'intérieur desdites cellules, sans que ledit anticorps ne se lie de manière substantielle aux cellules normales; et (iii) la détection du signal au moyen d'un détecteur de signal; et (iv) la conversion du signal détecté en une image des cellules cancéreuses.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes.

5

Figure 1 : Expression de la protéine ICBP90 dans les cellules HeLa (cellules tumorales) et dans les fibroblastes pulmonaires humains en culture primaire (cellules non tumorales).

La détection de la protéine endogène ICBP90 a été réalisée 10 sur des extraits totaux de protéines de cellules HeLa à confluence (piste 1) ou en prolifération (piste 2) et sur des extraits totaux de protéines de fibroblastes pulmonaires humains en culture primaire à confluence (piste 3) ou en prolifération (piste 4). Après migration 15 sur gel de polyacrylamide 8% en présence de SDS, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par électrotransfert. La révélation est réalisée à l'aide de l'anticorps 1RC1C-10 dilué au 1/4000 (concentration initiale 2 mg/ml) et d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et dirigé contre les chaînes lourdes d'anticorps de souris. Dans les pistes 20 correspondant aux extraits de cellules HeLa, on observe une bande majeure à 97 kDa ; pour les cellules HeLa en prolifération, des bandes supplémentaires de tailles inférieures à 97 kDa apparaissent (piste 2). Dans les fibroblastes pulmonaires humains à confluence, la protéine endogène n'est pas exprimée (piste 3) et 25 apparaît lorsque les cellules se mettent à proliférer (piste 4). Ces observations suggèrent que la protéine endogène ICBP90 est un marqueur de prolifération cellulaire pour des cellules normales (fibroblastes) tandis que pour les cellules tumorales elle serait un marqueur quelque soit le stade cellulaire.

30

Figure 2 : Immunoprecipitation de la protéine endogène

L'immunoprecipitation est réalisée sur des extraits protéiques totaux de cellules MOLT-4. L'anticorps 1RC1C-10 est fixé sur des billes de protéine G sépharose, puis mis en contact avec les extraits protéiques pendant 2 heures à température ambiante. Après lavage les complexes billes/1RC1C-10/protéine sont précipités par centrifugation et analysés par migration sur gel de polyacrylamide 8% en présence de SDS, puis transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation comme indiqué dans la figure 1. On observe une bande unique de 97 kDa, ainsi qu'une bande de 45 kDa qui correspond à la chaîne lourde de 1RC1C-10.

Figure 3 : Localisation nucléaire de la protéine endogène

Nous avons utilisé des cellules HeLa pour examiner l'expression endogène de la protéine ICBP90 *in situ* à l'aide de l'anticorps 1RC1C-10 et d'un anticorps secondaire antisouris couplé au fluorochrome CY3. Le marquage est localisé exclusivement dans le noyau. Le nucléole et le cytoplasme ne sont pas marqués.

20

Figure 4 : Expression de l'ICBP59 endogène dans les cellules en prolifération

Nous avons observé la protéine endogène sur des coupes en paraffine d'appendice humain. Après déparaffinage et prétraitement par chauffage en tampon acide (démasquage des sites antigéniques), les coupes sont incubées pendant 16 heures avec l'anticorps 1RC1C-10 dilué au 1/10000 (concentration initiale de 2 mg/ml). La révélation se fait par mise en contact avec un anticorps secondaire biotinylé, puis incubation avec le complexe streptavidine-péroxidase. Une contre coloration des noyaux à

l'hématoxyline de Harris est également réalisée. Le marquage par 1RC1C-10 est localisé essentiellement dans des zones de prolifération cellulaire. Les cellules marquées se trouvent dans les cryptes glandulaires (CG) ainsi que dans les zones germinatives 5 (ger).

Figure 5 : Expression de ICBP-59 dans divers tissus humains

Nous avons évalué le niveau d'expression de l'ARNm correspondant à ICBP59 sur un dot blot d'ARN comportant 50 10 tissus humains différents. Le blot a été hybridé pendant 16 heures à 68° C avec une sonde d'ADNc radioactive (³²P) de 679 pb dans une solution d'hybridation ExpressHyb (Clontech). Après lavages, on réalise une révélation par autoradiographie (exposition une semaine à 80°C). Les tissus présentant le plus haut niveau 15 d'expression sont le thymus adulte et fœtal, ainsi que la moelle osseuse adulte et le foie fœtal.

Figure 6 : Séquence nucléotidique de ICBP90

L'ADNc codant pour ICBP90 comporte 2379 pb. Les portions 20 de séquence indiquées en gras sont celles qui n'apparaissent pas dans les bases de données d'EST humains (human dbest). Les autres parties de la séquence existent dans diverses EST:
de 1 à 325 : EST n° AI083773.
de 367 à 865 : EST n° AA811055.
25 de 940 à 1857 : EST n° AA488755, EST n° AA129794 et
EST n° AA354253.

Figure 7 : Séquence protéique de ICBP90

La séquence en acides aminés de ICBP90 est déduite par 30 traduction de la séquence nucléotidique de la figure 6. ICBP90

comporte 793 résidus et présente un poids moléculaire théorique de 89,758 kDa. Le pKi est de 7,7. Les acides aminés indiqués en gras correspondent à ICBP-59.

5 **Figure 8 : Détection de l'ICBP90 dans les sera de patients ayant des marqueurs sériques élevés de tumeurs solides.**

Un volume de 2 μ l de sérum de chaque patient est dilué dans 1 ml de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline 1X) contenant 0,1% de tween 20 suivi de dilutions croissantes réalisées dans le même 10 tampon comme indiqué dans la figure. Un échantillon de 0,5 ml de chaque dilution est filtré sur la membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil « Slot Blot BioRad ». La membrane est bloquée en présence de tampon PBS (contenant 0,1% de tween 20 et 5% de lait) pendant 1 heure à température ambiante. La protéine ICBP90 15 est révélée à l'aide de l'anticorps 1RC-1C10 (1ng/ml) et de l'anticorps secondaire (anti-souris couplé à la peroxydase dilué au 1/5000). Les bandes sont révélées par chimiluminescence par exposition pendant 10 secondes d'un film X-MAT (Kodak).

20 **Figure 9 : Organisation structurale du gène ICBP90.**

A . Des exons représentés par des boîtes : les boîtes grises représentent des exons codants ; des boîtes blanches représentent des exons non-codants. La taille des exons est indiquée en pb dans chaque boîte, et les noms des exons sont identiques au-dessus des 25 boîtes. Les introns sont mentionnés de manière schématique par des lignes fines et leur taille approximative est indiquée en pb. Un site putatif de démarrage de la transcription et un signal consensus de polyadénylation sont indiqués. L'ATG est le codon de début de traduction et TGA le codon d'arrêt de la traduction.

B. Séquence de la région 5' flanquante du gène ICBP90 (Seq ID N° 12) (Numéro d'accession Genbank N° AF 220 226 déposée le 30 décembre 1999). Les exons sont en majuscules et les introns en minuscules. Le codon de début ATG est en majuscules gras, les 5 boîtes riches en GC (GC) et les boîtes CCAAT (CB) sont représentées en minuscules gras.

Figure 10 : Analyse du promoteur d'ICBP90

Les séquences du promoteur d'ICBP90 ont été fusionnées à 10 la séquence du gène « reporter » CAT dans le vecteur pBLCAT2 qui a ensuite été transfecté dans les cellules COS-1.

Une représentation schématique de ces constructions est représentée sur la gauche, avec le nombre se référant aux nucléotides en amont du codon d'initiation. Les activités CAT 15 relatives des extraits cellulaires correspondant à l'induction de l'activité du promoteur TK minimal sont exprimées en pourcentage (à partir de trois expériences de transfection indépendantes) et sont indiquées sur la droite.

20 Figure 11 : Analyse par Northern Blotting et Western Blotting de l'expression d'ICBP90.

A. L'hybridation Northern a été effectuée sur une membrane de Northern Blotting dont les dépôts d'ARN proviennent de lignées cellulaires cancéreuses de différents organes. Une sonde spécifique 25 d'ICBP90, synthétisée par PCR, et marquée à la digoxigénine, a été utilisée pour la détection des ARN_m d'ICBP90. Les tailles des ARN_m sont mentionnées sur la droite de la ligne 7.

Les lignes 1 à 7 contiennent des ARN provenant respectivement de la lignée leucémique promyélocyttaire HL-60, de 30 Hela 53, de cellules K562 de leucémie myélogène chronique, de

cellules de leucémie lymphoplastique MOLT-4, de cellules Raji du lymphome de Burkitt, de cellules SW480 d'adénocarcinome colorectal, et de cellules A549 de carcinome pulmonaire.

L'histogramme montre les taux d'expression des ARNm correspondant aux bandes de 5,1 kb et de 4,3 kb exprimés en pourcentage du taux d'expression de l'ARNm de 5,1 kb des cellules HL-60 (ligne 1, figure 11A).

B. Analyse en Western Blotting de l'expression de ICBP90 dans les cellules MOLT-4 et Hela.

Des lysats de cellules totales de cellules Hela et MOLT-4 en prolifération ont été préparés. L'expression d'ICBP90 a été analysée en Western Blotting en utilisant l'anticorps 1RC1C-10.

15 EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE D'UNE NOUVELLE PROTEINE DE LIAISON A LA SEQUENCE ICB

1.1. Construction reportrice pour le criblage de la banque

Le système du simple hybride est une technique puissante qui permet de détecter *in vivo* chez la levure l'interaction de protéines avec des séquences d'ADN spécifiques en criblant des banques d'ADNc. Ceci permet d'évaluer directement l'ADNc correspondant de la protéine à lier. Plusieurs études ont permis d'identifier la nouvelle protéine dans cette méthode. Ces méthodes décrivent très bien les protocoles utilisés (Inouye *et al.*, 1994 ; Wang et Reed, 1993).

Brièvement, les oligonucléotides suivants ont été synthétisés
5'- AATTCGATTGGTTCTGATTGGTTCTGATTGGTTCTT-3' et 5'-
CTAGAAGAACCAATCAGAACCAATCAGAACCAATCG-3'. Ces
30 nucléotides sont ensuite hybridés. Selon les instructions du

fabricant (Clontech, Palo Alto, CA), la construction reportrice cible possède trois copies en tandem de la séquence ICB2 (ICB2X3). Comme mentionné plus haut, une copie de ICB2 est soulignée et les séquences CCAAT sont représentées en gras. Pour déterminer la 5 spécificité de liaison des protéines à la boîte ICB, les oligonucléotides suivants qui contiennent trois copies en tandem de la boîte GC1 (GC1X3) et également présents dans le promoteur ont été synthétisés et hybridés:

5'- AATT~~C~~GGGGC~~G~~GGGCCGGGGCGGGGCCGGGGCGGGGCT-3'
10 5'- CTAGAGCCCCGCCCCGGCCCCGCCGGCCCCGCCGGG-3'

Les fragments d'ADN cible résultant sont clonés dans le polylinker d'un plasmide intégratif pHISi-1 (Clontech) par ligation des extrémités cohésives au niveau du site EcoRI et XbaI, en amont du promoteur minimal du gène *his3*. La souche de levure YM4271 15 (Clontech) est utilisée pour la transformation et des colonies de levure ayant intégrées le plasmide dans leur génome sont sélectionnées sur un milieu synthétique Dropout ne contenant pas d'histidine. Deux clones ont été isolés : un pour ICB2 et un pour la boîte GC1.

20

1.2. Criblage de la banque

Une banque d'ADNc de la lignée cellulaire Jurkat clonée au site d'EcoRI du polylinker en aval de GAL4-AD du vecteur pGAD10 25 (Clontech) est utilisée pour le criblage selon les instructions du fabricant. Des clones positifs sont sélectionnés puis cultivés sur un milieu sélectif déplété en histidine et en leucine. L'ADN plasmidique de ces clones est récupéré et introduit par électroporation dans des bactéries *Escherichia coli* XL1-blue. Le séquençage des inserts a été réalisé sur une matrice d'ADN plasmidique purifiée à partir d'une 30 culture d'1,5 ml utilisant un kit de mini préparation (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA). Une banque d'ADNc de thymus humain cloné dans λgt10 (Clontech) a été criblée par hybridation sur une plaque, pour récupérer un ADNc codant la partie N-terminale de la protéine.

5

1.3. Découverte de ICBP-59

Les ADNc de quatre clones ayant rempli les critères de sélection du système simple hybride ont été séquencés, et les profils analysés à l'aide de bases de données informatiques (Genbank, 10 EMBL, PDB, Swissprot) afin de déterminer la nature des protéines codées. Deux clones correspondent à des protéines ribosomales (hRS12 et hRS4), un à une sérine-thréonine kinase (STPLK-1) et le quatrième à une protéine humaine d'un poids moléculaire théorique de 59 kDa (calculé à partir de la séquence traduite) et 15 non répertoriée.

Les ADNc, codant pour hRS4, hRS12 et ICBP-59 et obtenus par digestion par EcoRI des clones positifs obtenus dans le vecteur pGAD10, ont été clonés au site EcoRI du vecteur d'expression pGEX-4T-1 (Pharmacia). Les ADN recombinants sont ensuite 20 transformés dans une souche d'*Escherichia coli* adaptée (BL21). 500 ml de culture du clone sélectionné ont été utilisés lorsque une densité optique de 0,5 a été atteinte. La surexpression des protéines d'intérêt a été induite par l'IPTG (1mM) pendant 2h à 37° C. Le vecteur pGEX-4T-1 conduit à l'obtention de grandes quantités 25 de protéines sous forme fusionnée à la glutathion-S-transférase (GST). Les protéines de fusion avec la glutathione-S-transférase (GST) sont ensuite purifiées en utilisant des billes de sépharose couplé au glutathion (Pharmacia) suivi par une coupure durant la nuit avec de la thrombine (0,05 U/ml) à 4° C (Pharmacia).

Pour tester l'aptitude de la protéine de poids moléculaire de 59 kDa à lier spécifiquement les boîtes ICB1 et/ou ICB2, trois copies en tandem de ICB2 (ICB2X3, séquences décrites précédemment) ont été marquées au niveau terminal au phosphore 5 ^{32}P en utilisant la polynucléotide kinase T4 (New England Biolabs) et du $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP (160 mCi/mmol, ICN Irvine, CA, USA). Pour examiner la spécificité de la liaison, des oligonucléotides contenant seulement une copie de la boîte CCAAT ont été synthétisés :

ICB1: 5'-AGTCAGGG**ATTGG**CTGGTCTG-3';

10 5'-CAGACCAG**CCAAT**CCCTGACT-3'

ICB2: 5'-AAGCTACG**ATTGG**TTCTTCTG-3';

5'-CAGAAGAAC**CCAAT**CGTAGCTT-3'.

La protéine ICBP-59 purifiée (1 μg) est incubée avec 1 ng d'oligonucléotide marqué à son extrémité terminale par du phosphore ^{32}P dans 12% de glycérol, 12 mM d'HEPES-NaOH (pH 7,9), 60 mM KCl, 4 mM Tris-HCl (pH 7,9), 100 ng BSA, 0,6 mM DTT et 100 ng de poly(dI/dC) dans 20 μl (Inouye et al., 1994). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le mixte réactionnel est chargé sur des gels de polyacrylamide à 6%. Dans les expériences de compétition, la quantité indiquée d'oligonucléotides non marqués est ajoutée au mixte réactionnel 10 min avant l'addition de protéines. Pour examiner les propriétés de liaison de l'ICBP90 à la boîte ICB2, le même protocole est utilisé à la différence que l'oligonucléotide marqué contient seulement une copie de la séquence CCAAT telle que décrite ci-dessous:

ICB2: 5'-ATAAAGGCAAGCTACG**ATTGG**TTCTGGACGGAGAC-3'

5'-GTCTCCGTCCAGAAC**CCAAT**CGTAGCTTGCCTTTAT-3'

La spécificité de liaison est étudiée en utilisant un nucléotide non marqué contenant une boîte GC du promoteur du gène de la topoisomérase II α humaine :

5'-GAATTGAGGGTAAAGGGGGCGGGGTTGAGGCAGATGCCA-3'

5 5'-TGGCATCTGCCTCAACCCCGCCCCCTTACCCCTCGAATTC-3'.

Ces expériences de retard de migration sur gel d'acrylamide, nous ont permis de mettre en évidence que la nouvelle protéine humaine de 59 kDa est capable de lier une séquence d'ADN de type ICB, et ce de manière spécifique. Nous avons appelé cette protéine

10 ICBP-59 (pour Inverted CCAAT Box Binding Protein of 59 kDa).

EXEMPLE 2 : CARACTERISATION DE LA PROTEINE ICBP90

2.1. Synthèse d'anticorps

15 Les anticorps monoclonaux de souris sont synthétisés dans notre Laboratoire par injection de la protéine ICBP-59 par les méthodes traditionnelles (Brou *et al.*, 1993) ; la protéine a été au préalable purifiée par un système de fusion GST. Deux anticorps monoclonaux de 1RC1C-10 et 1RC1H-12 ont été sélectionnés pour
20 leur performance à détecter la protéine endogène correspondant à la protéine ICBP-59 à la fois dans des expériences de Western blotting et dans des expériences d'immunocytotomie. Avant utilisation, les anticorps sont purifiés sur colonne DEAE-cellulose (DE52, Whatmann) à partir des liquides d'ascites.

25

2.2. Mise en évidence de la protéine endogène par Western Blotting

Afin de détecter la protéine endogène correspondant à ICBP-59, nous avons dans un premier temps utilisé 1RC1C-10 en
30 Western blot (0,4 µg/ml d'anticorps monoclonaux 1RC1C-10) sur des

extraits nucléaires de cellules HeLa en situation de prolifération et de confluence (Figure 1). Les cellules COS-1 et HeLa sont cultivées tel que décrit précédemment (Brou *et al.*, 1993 ; Gaub *et al.*, 1998; Rochette-Egly *et al.*, 1997). Les cellules MOLT-4 sont cultivées dans 5 de l'air à 100% dans du RPMI supplémenté par 10% de sérum de veau fetal. Les fibroblastes pulmonaires humains en culture primaire sont préparés et cultivés dans du DMEM/F12 tel que décrit précédemment (Kassel *et al.*, 1998). Des extraits nucléaires de cellules Jurkat ont été achetés chez Sigma alors que ceux de 10 MOLT-4 et HL60 ont été préparés tel que décrit auparavant (Lavie *et al.*, 1999). Les cellules HeLa en phase de croissance et les fibroblastes pulmonaires humains sont obtenus par déplétion de la culture en sérum pendant 30 h suivi par la réintroduction pendant 16 heures par 10% de sérum de veau fétal (v/v). La prolifération est 15 arrêtée lorsque la confluence atteint 60 à 70%. Les cellules arrêtées à confluence (confluence de 100%) sont obtenues de manière concomitante en omettant l'étape de déplétion en sérum. Pour ces deux types cellulaires, des lysats cellulaires bruts sont préparés en récoltant les cellules dans du PBS (phosphate buffer saline) suivi 20 d'une étape de sonication. Pour les expériences d'immunotransfert des lysats de cellules totales et des extraits nucléaires sont chargés sur des gels de polyacrylamide SDS à 8% pour réaliser une électrophorèse en une dimension. Les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose bloquées avec un réactif de 25 blocage 10% (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) et incubées avec l'anticorps monoclonal purifié (1RC1C-10) à la concentration de 0,5 µg/ml. Un anticorps anti-souris de mouton couplé à la phosphatase alcaline (fragments Fab, Roche Molecular Biochemicals) est utilisé à une dilution de 1/2 500. Des signaux

sont détectés en utilisant le chlorure de 4-nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate comme substrat.

Ces expériences montrent que la protéine endogène présente un poids moléculaire apparent d'environ 97 kDa. En outre, on observe que les formes de la protéine varie en fonction de la nature tumorale ou non-tumorale des cellules ainsi que de l'état de confluence ou de prolifération des cellules. En effet, dans les pistes correspondant aux extraits de cellules HeLa, on observe une bande majeure à 97 kDa ; pour les cellules HeLa en prolifération, des bandes supplémentaires de tailles inférieures à 97 kDa apparaissent (piste 2). Dans les fibroblastes pulmonaires humains à confluence, la protéine endogène n'est pas exprimée (piste 3) et apparaît lorsque les cellules se mettent à proliférer (piste 4). Ces observations suggèrent que la protéine endogène ICBP90 est un marqueur de prolifération cellulaire pour des cellules normales (fibroblastes) tandis que pour les cellules tumorales elle serait un marqueur quelque soit le stade cellulaire.

L'utilisation de l'anticorps monoclonal dans des expériences d'immunoprecipitation sur des extraits de protéines nucléaires, suivies d'un Western blot, conduit de la même manière à la mise en évidence d'une protéine de 97 kDa (Figure 2).

Les résultats obtenus en Western blot, aussi bien pour les extraits de protéines nucléaires que pour les immunoprecipitations, montrent que la protéine de 59 kDa isolée à l'aide du système simple hybride ne constitue qu'un fragment de la protéine endogène humaine correspondante, en l'occurrence le fragment C-terminal à partir du résidu D263. Il nous a donc fallu entreprendre un nouveau criblage de banque d'ADNc.

2.3. Analyse en Dot Blot d'ARN de multiples tissus humains

Afin de choisir une banque nous donnant le plus de chance possible d'isoler la protéine complète, nous avons voulu identifier un tissu humain exprimant l'ARN messager (ARNm) correspondant en quantité importante. A l'aide d'une sonde d'ADNc recouvrant une partie de la séquence de ICBP59 et marquée au ^{32}P , nous avons testé l'expression de l'ARNm d'intérêt dans 50 tissus humains différents sur un dot blot d'ARN. Brièvement, une sonde longue de 678 paires de bases correspondant à la séquence en acides aminés 5 269 à 500 de ICBP90 a été synthétisée par PCR en utilisant de la Taq polymérase (Sigma, St Louis, MO, USA). La sonde marquée par random priming en utilisant du dCTP- α ^{32}P est purifiée sur 10 colonnes Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Suède).

Un dot blot d'ARN de multiples organes contenant de l'ARN 15 poly(A) $^+$ de 50 tissus humains différents est hybride 20 heures dans des conditions de forte stringence dans un milieu ExpressHyb (Clontech) à 68° C avec une sonde marquée au ^{32}P . Des lavages à haute stringence sont réalisés dans du 0,1 x SSC, 0,1% SDS à 68° C (De Vries *et al.*, 1996).

20 Les résultats obtenus (figure 5) montrent que les tissus exprimant le plus fortement l'ARNm de la protéine ICBP-59 sont le thymus adulte et fœtal, ainsi que la moelle osseuse adulte et le foie fœtal. Pour isoler la protéine entière, notre choix s'est donc porté 25 sur une banque d'ADNc de thymus adulte.

25

2.4. Criblage de la banque et clonage de ICBP90

Le criblage de la banque nous a permis d'obtenir plusieurs clones d'environ 4000 paires de bases (pb) comportant un cadre de lecture ouvert de 2379 pb (Fig.6). Cette séquence code pour une 30 protéine de 793 acides aminés (Fig.7) dont le poids moléculaire

théorique (calculé à partir de la séquence traduite) est de 89,758 kDa. Nous avons appelé cette protéine ICBP90 (pour Inverted CCAAT Box Binding Protein of 90 kDa) par analogie avec l'appellation utilisée pour la protéine initiale de 59 kDa.

5 L'ADNc ICBP90 (2379 bp) a été synthétisé par PCR en utilisant l'ADN polymérase Deep Vent (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) et les oligonucléotides utilisés au cours de cette réaction de PCR étaient voisins du site de EcoRI. Le produit de réaction a été par la suite souscloné dans un vecteur pGEX-4T-1
10 (Pharmacia) pour l'expression de la protéine de fusion GST dans BL21. La surexpression est induite par IPTG (1mM) pendant 4h à 25° C. La protéine ICBP90 est ensuite purifiée.

2.5. Immunocytochimie et immunohistochimie.

15 L'observation directe de la protéine ICBP90 sur des cellules et tissus a été également mise en œuvre.

Des cellules COS-1 ont été transfectées comme décrit précédemment (Brou *et al.*, 1993 ; Gaub *et al.*, 1998) avec le vecteur pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA) dans lequel l'ADNc de ICBP90
20 (2379 bp) a été sous-cloné dans le site de restriction EcoRI. L'ADNc est synthétisé par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) utilisant la polymérase Deep Vent (New England Biolabs) et des oligonucléotides flanquants le site de restriction EcoRI. La construction plasmidique est vérifiée par séquençage.
25 L'immunomarquage des cellules HeLa et des cellules COS-1 transfectées est réalisé tel que décrit précédemment (Brou *et al.*, 1993) avec respectivement les anticorps monoclonaux 1RC1C-10 et 1RC1H-12. Un marquage indirect à l'immunopéroxidase de ICBP90 et de topoisomérase II α est réalisé comme décrit précédemment (Rio
30 *et al.*, 1987, Devys *et al.*, 1993). Les appendices humains ont été

inclus dans la paraffine et fixés dans du formalin 10% tamponé (Sigma). Des coupes séries (3 µm) sont incubées durant la nuit à température ambiante avec l'anticorps 1RC1C-10 et avec l'anticorps anti-topoisomérase II α (NeoMarkers, Union City, CA, USA). Des 5 anticorps liés de manière spécifique sont visualisés par un complexe utilisant la streptavidine biotine (LAB/LSAB method, Dako LSAB2 System kit ; DAKO, Carpinteria, CA, USA).

En immunocytochimie, l'anticorps 1RC1C-10 marque le noyau des cellules HeLa tandis que le nucléole et l'ensemble du 10 cytoplasme ne sont pas marqués (Figure 3). En immunohistochimie, des coupes en paraffine d'appendice humain montrent un marquage localisé essentiellement dans des zones de prolifération cellulaire (Figure 4). En effet, les cellules marquées sont logées dans les cryptes glandulaires (CG) ainsi que dans les 15 zones germinatives (Ger). Un marquage identique est obtenu lorsqu'on utilise un anticorps anti-topoisomérase II α qui est une enzyme uniquement exprimée dans des cellules en prolifération (résultats non illustrés).

20 2.6. Recherches BLAST et prédition de domaines

Les études sur BLAST en ligne ont été réalisées à partir des informations du National Center for Biotechnology Information au National Institute of Health (Bethesda, MD, USA). SCANPROSITE et PROFILESCAN sont utilisés pour l'analyse protéique (Infobiogen, 25 Villejuif, France).

ICBP90 comporte un domaine « ubiquitin-like » dans ses 80 premiers acides aminés, deux sites de localisation nucléaires potentiels dans la partie C-terminale et deux domaines en doigt de zinc (« zinc-finger »), dont l'un serait impliqué dans la liaison à 30 l'ADN et l'autre dans des interactions protéine-protéine. Plusieurs

sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C, la caséine kinase II ainsi que par une tyrosine kinase sont également présents.

La production et la purification de ICBP90 à l'aide du système 5 de fusion GST (même procédé que celui utilisé pour ICBP-59) nous a finalement permis de tester la capacité de la protéine complète à lier les séquences d'ADN de type ICB. Son comportement est en tous points identique à celui observé pour ICBP-59.

En définitive, nous avons isolé une nouvelle protéine 10 humaine que nous avons appelée ICBP90 pour les raisons évoquées ci-dessus. Son poids moléculaire théorique est de 89,758 kDa et son poids moléculaire apparent sur gel d'acrylamide est de 97 kDa. Cette protéine est non seulement localisée exclusivement dans le 15 noyau des cellules humaines, mais elle présente également la capacité à lier des séquences d'ADN de manière spécifique, en l'occurrence des séquences de type CCAAT. Pour ces raisons, nous pensons que ICBP90 a la possibilité de moduler l'expression des gènes dont le promoteur est pourvu de boîtes CCAAT, éventuellement en position inversée (ICB). Le gène de la 20 topoisomérase II α humaine qui nous intéresse plus particulièrement, et qui comporte cinq séquences ICB dans son promoteur, nous semble être une des cibles privilégiées de ICBP90.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence les caractéristiques remarquables de l'anticorps 1RC1C-10 qui ne 25 marque uniquement que les cellules en prolifération dans le cas de cellules non cancéreuses ; il marque les cellules cancéreuses en prolifération ou en quiescence ; il est utilisable dans 4 techniques différentes (Western blotting, immunocytochimie, immunohistologie, immunoprécipitation) ; il possède une très 30 bonne affinité et permet d'utiliser une dilution de 1/150 000 en

immunohistochimie (i.e. 13 ng/ml) ; enfin, son utilisation ne génère quasiment pas de bruit de fond.

Les applications futures de IIRCIC-10 se situent en premier lieu dans les domaines du diagnostique et de la recherche fondamentale. Pour le diagnostique en anatomo-pathologie par exemple, il serait tout à fait possible de rendre compte de l'état prolifératif d'un tissus cancéreux donné. Concernant la recherche fondamentale, des investigations sont en cours dans notre laboratoire afin de déterminer la contribution exacte de ICBP90 dans les mécanismes de prolifération des cellules normales et des cellules cancéreuses. Or, pour l'étude de l'expression de ICBP90 en fonction du cycle cellulaire, de sa localisation nucléaire précise et de son interaction avec d'autres protéines cellulaires, l'utilisation de l'anticorps sera incontournable.

15 Pour l'instant nous n'avons pas étudié l'expression de l'ICBP90 en fonction du cycle cellulaire. Néanmoins, dans le cas où des lignées de cellules cancéreuses sont confluentes ou lorsqu'elles sont en prolifération nous ne pouvons détecter de différences significatives de l'expression de l'ICBP90 (Fig. 1) du moins en ce qui concerne la forme à 97 kDa. Par contre, dans des cellules confluentes non cancéreuses (cellules musculaires lisses bronchiques humaines) l'expression de l'ICBP90 est difficilement détectable (résultats non illustrés). Ceci est confirmé sur les coupes histologiques où aucune cellule en quiescence n'est marquée par l'anticorps. Il est par conséquent possible que l'ICBP90 soit exprimée quelle que soit la phase du cycle cellulaire dans des cellules cancéreuses alors que son expression varierait en fonction de chaque phase dans des cellules non cancéreuses. Ceci rend donc l'utilisation de l'anticorps extrêmement intéressante, en ce sens que nous aurions à disposition un marqueur de la

prolifération cellulaire de tissus cancéreux qui ne dépendrait pas de la phase du cycle cellulaire contrairement à d'autres marqueurs de prolifération cellulaire tels que le Ki-67, la topoisomérase II α , la cycline E et la cycline B1. En effet, la fin de la phase S est 5 caractérisée par une très faible expression de Ki-67, la cycline E marque les cellules en fin de phase G1 jusqu'au milieu de la phase S et la cycline B1 marque les cellules en phase G2/M (pour revue Darzynkiewicz *et al.*, 1994). Par ailleurs, il a été montré que PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) surestime le nombre de cellules 10 en prolifération dans certains types de tissus (Roskell and Biddolph, 1999).

ICBP90 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire en régulant l'expression de gènes tels que celui de la topoisomérase II α . Différentes stratégies visant à bloquer l'action de cette protéine 15 doivent permettre de modifier la prolifération cellulaire. Ainsi, l'utilisation de l'anticorps IRCIC-10 ainsi que l'utilisation de peptides mimant l'interaction ADN/ICBP90 sans pour autant engendrer d'effet physiologique subséquent constitue une possibilité intéressante. Le design de ses peptides s'inspirerait 20 directement de la séquence protéique de ICBP90 que nous avons décrite. Une forme tronquée correspondant à ICBP59 pourrait par exemple être un des premiers candidats.

Le blocage pur et simple de l'expression de ICBP90 dans le but d'éliminer complètement son influence sur les gènes et par 25 extension sur la prolifération cellulaire peut être envisagé ; il peut se faire soit par une approche classique en obtenant des inhibiteurs de la protéine, soit en utilisant une approche plus moderne correspondant à la technique d'interférence par l'ARN double brin (RNA interference ou RNAi) telle que décrit récemment par 30 Kennerdell & Carthew (1998).

**EXEMPLE 3 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU GENE
ICBP90**

5 3.1. Matériels et méthodes

**3.1.1. Construction et criblage d'une banque
génomique placentaire humaine**

Après digestion partielle avec l'enzyme *Mbo*I, l'ADN 10 génomique placentaire a été fractionné en fonction de la taille sur un gradient de 10 à 40% de sucrose. Des fragments d'ADN de 15 kb ont été ligués dans un vecteur λ GEM12 préalablement digéré par *Bam*HI (Promega, Madison WI, USA). Après empaquetage, les particules de phages λ ont été titrées sur des cellules TAP 90. La 15 banque génomique contient 3.10^6 unités formant des plaques (plaques forming units, pfu). 10^6 clones ont été étalés pour l'analyse. Une sonde de 620 pb correspondant à une extrémité 5' terminale de l'ADN_c de ICBP90 utilisée pour le criblage a été marquée au $\alpha^{32}P$ -dCTP par une méthode d'amorçage aléatoire 20 (random priming) (Sambrook *et al.*, 1989). La sonde marquée est utilisée selon un protocole classique d'hybridation sur plaque pour cribler la banque génomique (Sambrook *et al.*, 1989). L'hybridation a été réalisée à 68°C dans du 5X SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM citrate de sodium pH 7,0), 5 X de solution Denhardt, 100 µg / ml d'ADN de 25 sperme de saumon et 0,1% de SDS, suivi par 30 minutes de lavages dans du 2X SSC, 0,1% SDS à température ambiante.

Deux étapes de criblage ont été réalisées pour purifier un clone positif. Le clone positif a ensuite été digéré avec l'enzyme *Not*I et deux fragments de 6 et de 10 kb ont été sous-clonés dans le

vecteur pBluescript-SK⁺ (Stratagène, La Jolla CA, USA) selon un protocole standard (Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.2. Criblage de la banque d'ADN_c de thymus humain

5

Une banque λGT10 d'extrémité 5' d'ADN_c de thymus humain (Clontech, Palo Alto, CA, USA) a été criblée par hybridation sur plaque en utilisant la sonde d'ADN_c de 679 pb synthétisée telle que dans le paragraphe relatif à l'analyse par Northern Blotting. Des 10 signaux ont été détectés en utilisant du chlorure de 4-nitro-bleu-tétrazolium et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate comme substrat.

15

3.1.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur l'ADN génomique placentaire

L'ADN génomique placentaire a été préparé selon une méthode conventionnelle (Sambrook *et al.*, 1989). Pour la région 5' du gène ICBP90, les inventeurs ont utilisé le kit PCR Advantage[®]-GC genomic de Clontech qui est adapté aux régions riches en GC de l'ADN génomique. Pour couvrir les régions 3'-flanquantes, la Taq polymérase (Sigma, St Louis, MO, USA) et son tampon correspondant ont été utilisés. Les réactions ont été réalisées selon les instructions du fabricant en utilisant 250 ng d'ADN génomique placentaire comme matrice dans un volume final de 50μl. Afin d'obtenir l'amplification des introns de longueur 19 kb et 8,7 kb le système PCR Expand[™] 20kb^{plus} (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a été utilisé.

La réaction a été réalisée dans 100 μ l en utilisant 125 ng d'ADN génomique placentaire par réaction.

3.1.4. Constructions plasmidiques et essais CAT

5

Une série de différents fragments ont été obtenus par PCR dans la région 5' flanquante du gène ICBP90 en utilisant des amorces de 20 nucléotides afin d'obtenir les constructions décrites dans la figure 10. Celles-ci contiennent un site de restriction 10 BamHI et l'ADN génomique placentaire humain a été utilisé comme amorce. Les produits PCR ont été digérés et sous-classés en amont du gène reporter chloramphénicol acétyl transférase (CAT) d'un vecteur contenant le promoteur minimal de la thymidine kinase (pBICAT2). Les constructions plasmidiques ont été vérifiées par 15 séquençage. Des cellules COS-1 ont été cultivées dans un milieu Dulbecco modifié par Eagle (DMEM) supplémenté avec 5% de sérum de veau fétal. Après l'étalement, les cellules ont été transférées avec les différentes constructions plasmidiques (5 μ g) en utilisant la technique de co-précipitation au phosphate de calcium 20 (Banerji *et al.*, 1981)). Les analyses d'expression de la CAT ont ensuite été réalisées comme décrit ailleurs (Goetz *et al.* (1996)).

3.1.5. Localisation chromosomique du gène ICBP90

25 Des chromosomes métaphysiques ont été préparés à partir de leucocytes humains du sang périphérique selon les protocoles standards (Haddad *et al.* (1988)). Brièvement, une sonde de 10 kb correspondant à un fragment 5' terminal du clone de 16 kb isolé à partir du criblage de la banque d'ADN génomique placentaire, a été 30 marquée avec de la biotine-16-dUTP (Roche Diagnostics) par « nick-

translation ». La sonde est ensuite précipitée avec un excès (50X) d'ADN humain Cot-1 (Life Technologies, Rockville MD), resuspendu dans 50% de formamide, 1X SSC, pré-hybridé pendant 2 heures à 37°C puis hybridé sur la nuit à 37°C. La détection est réalisée en 5 utilisant de l'avidine-FITC (Vector Laboratories, Burlingam CA). Les chromosomes ont été contre-colorés avec du 4'-6-diamino-2- phénylindole (Sigma).

10 **3.1.6. Analyse de Northern blotting et de Western Blotting**

Une membrane de Northern Blotting contenant 2 µg d'ARN polyA⁺ par ligne, provenant de 7 lignées cellulaires humaines cancéreuses différentes (Clontech) a été préhybridée dans du 15 Express Hyb (Clontech) puis hybridée avec la sonde spécifique de ICBP90 dans du Express Hyb à 68°C pendant deux heures. La sonde double-brin marquée à la digoxigénine a été préparée par amplification PCR d'un fragment de 676 pb à partir de l'ADNc d'ICBP90 (nucléotides 806 à 1 485 ; Numéro d'Accession Genbank 20 AF 129 507) selon les instructions du fabricant (Roche Diagnostics).

Après purification au travers d'une colonne de chromatographie Micro Bio-Spin 30 (Bio-Rad, Hercules, CA), la sonde spécifique ICBP90 (5 ng/ml) a été chauffée à 95°C pendant 25 15 minutes puis refroidie dans la glace avant l'addition de la solution d'hybridation. Les lavages après l'hybridation ont été réalisés deux fois dans du 2X SSC, 0,1% SDS (30 minutes par lavage à température ambiante), puis deux fois dans du 0,1X SSC, 0,1% SDS (30 min. par lavage à 68°C). La membrane a été traitée 30 avec la solution A (0,1 M acide malique, 0,15 M de NaCl à pH 7,5)

puis bloquée par incubation avec 1% d'agent bloquant (Roche Diagnostics) dans le tampon A pendant 30 minutes à température ambiante.

Un anticorps conjugué à la phosphatase-alcaline dirigé 5 contre la digoxigénine (fragment Fab, Roche Diagnostics) a été ajouté (150 mU/ml) puis incubé pendant 30 minutes à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée deux fois avec la solution A puis équilibrée dans du 0,1 M tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5. Pour la détection par chémiluminescence, les inventeurs ont 10 utilisé l'agent Disodium 3-(4-méthoxyspiro{1,2 dioetane-3,2'-(5'- chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] décan }-4-yl) phényl phosphate[®] (Roche Diagnostics) selon les instructions du fabricant. Les bandes d'ARN_m ont été quantifiées en utilisant le logiciel NIH image 1.62 et exprimées en pourcentage de la bande d'ARN_m la plus abondante 15 (c'est-à-dire la bande de 5,1 kb des cellules HL-60).

L'analyse en Western Blotting a été réalisée comme décrit ailleurs (Hopfner *et al.* (2000)). Les signaux ont été détectés en utilisant le chlorure de 4-nitro-blue tétrazolium / le phosphate de 5-bromo-4chloro-3-indolyl comme substrat.

20

**3.1.7. Outils de recherche d'alignement local de base,
prédictions de sites de démarrage de la
transcription et de signal polyA**

25 Des recherches d'alignement local de base ont été réalisées via le Centre National d'Information en Biotechnologie au National Institute of Health (Bethesda, MD, USA). Le criblage d'une banque de facteurs de transcription avec le programme d'ordinateur Mat Inspector, les prédictions de sites de démarrage de la transcription 30 (TSS) avec Neural Network, ainsi que la prédition de signal polyA,

ont été réalisés via le Baylor College of Medicine (Reese *et al.* (1996)).

3.2. Résultat

5

3.2.1. Isolement et caractérisation du gène de l'ICBP90

Une banque d'ADN complémentaire de placenta humain cloné dans le phage lambda GEM 12 a été criblée à l'aide d'une sonde d'ADN. Le criblage a conduit à la purification d'un seul clone positif ayant un insert de 16 kb. L'analyse de la séquence a permis de déterminer qu'il contenait une séquence intronique longue de 10 kb et contenant 3 exons (appelé B, C et D dans la figure 9A). Tous les autres criblages, incluant notamment ceux qui ont été réalisés par PCR sur des banques de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ou de YAC (Yeast Artificial Chromosome), n'ont pas permis d'isoler d'autres clones positifs. Par conséquent, nous avons décidé de déterminer le reste de l'organisation du gène par PCR directement sur de l'ADN génomique de placenta humain. La plus grande difficulté fut d'obtenir le côté 5' de l'intron de 19 kb. Ainsi, des amorces ont été choisies dans l'exon A (amorce sens) et dans le côté 5' du clone de 16 kb (amorce anti-sens). L'exon E et l'intron de 8,7 kb ont été amplifiés en utilisant une amorce sens dans l'exon D et l'amorce anti-sens dans l'exon F. Finalement, la séquence complète de l'exon F jusqu'au signal de poly-adénylation a été déterminée en utilisant une amorce sens choisie dans le début de l'exon F et l'amorce anti-sens dans le côté 3' d'une EST (référence dans GenBank n° AW297533) homologue à la séquence du gène de l'ICBP90. La séquence complète du gène de l'ICBP90 montre qu'il est composé de 6 exons codants dont la taille varie de 100 paires de

bases à 3453 paires de bases. La plupart des jonctions exons/introns répondent aux séquences consensus pour les sites accepteurs et donneurs d'épissage. Une séquence consensus de poly-adénylation (AATAAA) a été trouvée dans la région 3', c'est-à-dire 1152 nucléotides après le codon stop dans la figure 9A.

3.2.2 La région 5' du gène de l'ICBP90

Le criblage d'une banque d'ADN complémentaire de thymus humain cloné dans le phage lambda gt10 a conduit à l'obtention de deux populations de cDNA qui se distinguent l'une de l'autre dans leur région 5', exactement 10 paires de bases en amont du codon d'initiation, c'est-à-dire dans la région 5' non traduite. Ces deux populations de cDNA prédisent l'existence de deux exons alternatifs en 5' appelés exon I et exon II (Figure 9A). Nous avons observé que les exons I et II sont reliés à un site d'épissage alternatif interne de l'exon A. De plus, nous avons trouvé dans une base de données un EST (référence dans GenBank n° AI084125) correspondant aux nucléotides 1290 à 1356 (Figure 9B). Les positions de ces deux exons et de l'EST à l'intérieur du locus ont été déterminées par PCR. Pour cela nous avons utilisé des amorces correspondant aux 18 premiers nucléotides de chaque exon et une amorce anti-sens choisie dans le premier exon traduit (exon A). Cette stratégie nous a permis de reconstruire la région 5' telle qu'elle est représentée dans les figures 9A et 9B, avec l'exon I correspondant aux nucléotides 1 à 134 et l'exon II correspondant aux nucléotides 676 à 725. La séquence EST (AI084125) est contiguë au site d'épissage interne de l'exon A. Nous n'avons pas encore déterminé avec précision le début des exons I, II et A puisque leurs séquences ont été déduites à partir de criblages de banques de cDNA (Figure 9A).

Quatre boîtes GC (GC1 à GC4) ont été trouvées dans la région 5' (Figure 9B). Ces boîtes représentent des sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription Sp1, mais seulement une boîte (GC3) correspond à une séquence consensus, c'est-à-dire

5 GGGGCGGGG. De plus deux boîtes CCAAT (CB1 et CB2) ont été trouvées. Des analyses prédictives de séquences suggèrent que deux régions promotrices existent dans la région 5', c'est-à-dire avant le codon d'initiation (ATG). Deux sites potentiels d'initiation de la transcription ont été prédis aux positions 571 et 827. Le

10 premier suit la séquence consensus de liaison à Sp1 et le second suit la boîte GC1 (respectivement entre les exons I & II, et les exons II & A). Afin de voir si ces deux régions sont fonctionnelles en tant que région promotrice, plusieurs constructions plasmidiques contenant un gène rapporteur (gène de la Chloramphénicol Acétyl

15 Transférase; CAT) en aval des différentes régions promotrices potentielles ont été préparées. Des cellules COS ont été transfectées avec ces constructions plasmidiques. La figure 10 montre les résultats obtenus et qui correspondent au pourcentage d'augmentation de l'activité basale. L'activité maximale a été

20 obtenue avec la construction plasmidique contenant 1114 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction, avec une augmentation de 236,7% de l'activité promotrice basale (promoteur minimal du gène de la thymidine kinase). La construction plasmidique contenant 642 paires de bases en amont de l'ATG a

25 conduit à une augmentation de 115,6% alors que la construction plasmidique contenant uniquement la séquence entre l'exon I et l'exon II montrait une activité relativement faible avec une augmentation uniquement de 22,8% (figure 10). Ces résultats suggèrent l'existence d'une région promotrice entre les exons II et A.

3.2.3. Localisation chromosomique du gène ICBP90

La localisation chromosomique du gène ICBP90 a été réalisée par hybridation *in situ* de fluorescence (FISH). Le gène ICBP90 est localisé sur le chromosome 19p13.3 dans une région télomérique. Une recherche réalisée dans Genbank a montré qu'une région de 6Mb dans la bande chromosomique 19 p 13.3 d'une banque de cosmidie spécifique du chromosome 19 (hybride homme / hamster 5HL2-B) contient 147 nucléotides codant pour les acides aminés 746 à 793 de ICBP90. Cette séquence a été localisée entre les marqueurs STS (sequence tagged site) D19S883 et D 19S325.

3.2.4 Expression de ICBP90 dans différentes lignées cellulaires

15

ICBP90 participe à la régulation de l'expression du gène TopII α (Hopfner *et al.* (2000)). Comme TopII α est exprimée de manière différentielle dans différentes tumeurs et lignées cellulaires, ICBP90 lui-même est susceptible d'avoir une régulation complexe en terme d'activité et d'expression génique.

Dans une première étape vers la compréhension des mécanismes régulant l'expression du gène ICBP90, l'ARN_m d'ICBP90 a été analysé dans différentes lignées cellulaires. L'ARN_m d'ICBP90 a été étudié dans la lignée cellulaire HL60 dérivée d'une leucémie promyélocyttaire (ligne 1), de cellule Hela S3 (ligne 2), de cellules de leucémie lymphoblastique MOLT-4, de cellules Raji du lymphome de Burkitt (ligne 5), d'adénocarcinome colorectal SW 480 (ligne 6), de cellules A549 de carcinome du poumon (ligne 7) (figure 11A).

Deux bandes d'ARN_m de 4,3 et 5,1 kb sont observées. Les quantités relatives d'ARN_m dans les bandes varient selon le type cellulaire. L'histogramme de la figure 11A montre les taux d'ARN_m dans les bandes de chacune des lignées cellulaires, exprimé en pourcentage de la quantité maximale observée de bandes d'ARN_m de 5,1 kb dans les cellules HL-60 (ligne 1, figure 11A). Dans les cellules MOLT-4, seule la bande d'ARN_m de 4,3 kb est observée, alors que dans les cellules de leucémies promyélocytaires la bande à 5,1 kb est prédominante. Dans les cellules Raji du lymphome de Burkitt, seule la bande à 5,1 kb est détectée. Approximativement, des quantités égales des deux types d'ARN_m sont observées dans les autres lignées cellulaires, c'est-à-dire les cellules Hela, K562, A549, SW 480. Pour les cellules HL-60, néanmoins, l'ARN_m de 5,1 kb est plus fortement exprimé que l'ARN_m de 4,3 kb. D'autres analyses ont été entreprises sur les cellules Hela pour confirmer que les 2 transcrits proviennent de la transcription du gène ICBP90. Une sonde d'ADNc de 626 pb marquée à la digoxigénine localisée immédiatement en amont du signal poly A (c'est-à-dire l'exon F) et utilisée comme sonde pour des expériences de Northern Blotting, a produit les mêmes résultats, c'est-à-dire l'apparition de deux bandes d'ARN_m de 4,3 kb et de 5,1 kb. Ce résultat confirme que les deux formes d'ARN_m sont générées à partir d'un seul gène.

Les inventeurs ont également étudié l'expression de la protéine ICBP90 afin de déterminer si ces deux isoformes d'ARN_m sont susceptibles de coder pour deux protéines différentes.

La figure 11B montre le profil d'expression de ICBP90 dans des extraits protéiques de cellules MOLT-4 et Hela. Alors qu'une seule bande de 97 kDa est observée dans les cellules MOLT-4, dans les cellules Hela, à côté de la bande de 97 kDa qui est doublée, plusieurs autres bandes d'un poids moléculaire inférieur sont

observées. Ces résultats suggèrent que, dans les cellules MOLT-4, un ARNm code pour une forme unique d'ICBP90. A l'inverse, dans les cellules Hela, les deux ARNm sont susceptibles de conduire à la production de différents isoformes d'ICBP90.

5

3.3 Commentaires

Le gène ICBP90 s'étend sur environ 35,8 kb. Six exons traduits et deux exons non traduits, et de fait sept introns, ont été 10 identifiés par les inventeurs. Les deux domaines en doigt de zinc de ICBP90 sont codés par le même exon (exon F), contrairement au gène du récepteur aux œstrogènes humains dans lequel chacun des doigts-de-zinc putatifs du domaine de liaison à l'ADN du récepteur sont codés séparément (Ponglikitmongkol *et al.* (1988)). 15 Le domaine « ubiquitin-like » de ICBP90 est codé par les exons A et B alors que le domaine « leucine zipper » est codé par l'exon B. De manière intéressante, l'exon F seul est susceptible de coder pour une protéine fonctionnelle car elle code pour deux signaux de localisation nucléaire, les domaines zinc-finger et plusieurs sites 20 putatifs de phosphorylation. Deux grands introns de 8,7 kb et de 19 kb ont été trouvés.

Le gène ICPB 90 a été localisé dans la région chromosomique 19p13.3. Plusieurs autres gènes ont été localisés dans cette région, par exemple le Nuclear Factor I/C (également un facteur de 25 transcription liant CCAAT, (Qian *et al.* (1995)). De manière intéressante, une translocation atypique t (7 ; 19) dans la leucémie myélomonocytaire aiguë, impliquant un site fragile au locus 19p13.3 a été décrite (Sherer *et al.* (1991)). Egalement, il a été suggéré que les gènes impliqués dans le développement des 30 carcinomes pancréatiques sont localisés en 19p13.3 et 19q13.1-

13.2 (Hoglund *et al.* (1998)). Des réarrangements des bandes 14q32.3 et 19p13.3 d'une délétion préférentielle du bras court du chromosome 1 constituent des altérations chromosomiques non aléatoires dans le myélome multiple et la leucémie des cellules du plasma (Taniwaki *et al.* (1996)). D'autres gènes ont été localisés dans cette région ; ils incluent un gène impliqué dans l'adénocarcinome du syndrome Peutz-Jeghers (Gruba *et al.* (1998)). Egalement, il a été suggéré que le gène suppresseur de tumeur putatif pour l'adénome malin est localisé en D19S216 au niveau de la bande chromosomique 19p13.3 qui joue un rôle important dans la tumorigénèse de l'adénome malin (Lee *et al.* (1998)).

L'analyse de la séquence de la région 5' du gène ICBP90 a révélé l'existence de plusieurs exons non-traduits avec une région promotrice entre les exons II et A et probablement un second promoteur plus faible localisé entre les exons I et II. La région promotrice entre les exons II et A est un promoteur sans séquence TATA, suggérant que le gène ICBP90 peut être un gène de ménage, au moins lorsque ce promoteur est impliqué. En ce sens, il ressemble fortement aux régions promotrices des gènes ATF α (Goetz *et al.*, 1996), CRE-BP1 / ATF 2 (Nagase *et al.*, 1990) et TopII α , (Hochhauser *et al.*, 1992), qui ne contiennent pas de boîtes TATA canoniques mais plusieurs sites de liaison de SP-1.

Les boîtes GC et/ou CCAAT sont susceptibles d'être impliquées dans la régulation de l'expression du gène ICBP90 via les facteurs de transcription SP-1 et les protéines de liaison à CCAAT. De plus, étant donné que la protéine ICBP90 est une protéine de liaison à CCAAT, ICBP90 est également susceptible de réguler sa propre expression.

Une banque de données de facteurs de transcription a été ciblée à l'aide du programme d'ordinateur Mat Inspector du Baylor

College of Medicine, et de nombreux sites de liaison de facteurs de transcription ont été identifiés dans la séquence précédant le codon ATG (figure 9B). Parmi ces sites de liaison aux facteurs de transcription, il est intéressant de noter des sites de liaison du 5 facteur de transcription AP-2 régulé au cours du développement et qui contrôle l'expression de gène tel DR-nm 23 (Martinez *et al.* (1997)), les sites de liaison de la protéine myéloïde « zinc-finger » MZF 1 qui est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse (Hromas *et al.* (1996)).

10 L'analyse de Northern Blotting a démontré qu'il existe deux populations d'ARN_m de 4,3 kb et de 5,1 kb. De manière intéressante, chaque population présente une spécificité cellulaire. Par exemple, les cellules lymphoblastiques MOLT-4 expriment seulement l'ARN_m de 4,3 kb, alors que dans les cellules Raji du 15 lymphome de Burkitt (lymphocytes B matures), seul le transcrit de 5,1 kb est observé. Les cellules HL-60 expriment davantage d'ARN_m de 5,1 kb que d'ARN_m de 4,3 kb. Les cellules HL-60 et les cellules Raji du lymphome de Burkitt sont davantage différenciées que les cellules MOLT-4 suggérant que les taux d'expression du transcrit 20 de 5,1 kb par rapport à celui de 4,3 kb peut être directement corrélé avec l'état de différenciation des cellules.

De manière intéressante, une étiquette de séquence exprimée (EST, Expressed Sequence Tag) correspondant à la séquence 5' de l'exon A a été identifiée à partir d'oligodendrogiome anaplastique 25 (numéro d'accésion Genbank N° AI 084 125) alors qu'une EST correspondant à l'inclusion de l'exon II a été isolée à partir d'un mélange de tumeurs de cellules germinales (numéro d'accésion Genbank N° AI 968 662). Les résultats des inventeurs suggèrent donc que la régulation des transcrits ICBP90 est comparable avec 30 ce qui se passe pour le récepteur aux œstrogènes. En fait, six

transcrits différents codant une protéine commune, mais différent dans la région 5' non traduite du fait d'un épissage alternatif des exons amonts, ont été reportés (Flouriot *et al.*, 1998 et Grandien, 1996).

5 L'analyse en Western Blotting montre une bande majoritaire à 97 kDa dans les cellules MOLT-4 alors que plusieurs bandes sont observées dans les cellules Hela (Figure 11B). Ces données sont en accord avec l'existence de plusieurs ARN_m ICBP90 et/ou d'isoformes de la protéine ICBP90 dont le taux d'expression peut
10 être contrôlé de manière cellule-spécifique.

Deux isoformes protéiques pour le récepteur aux œstrogènes ont été décrits (Griffin *et al.*, 1999) qui diffèrent l'un de l'autre par les 41 amino-acides N-terminaux. La double-bande de 97 kDa observée à partir des cellules Hela (Figure 11B) est donc susceptible
15 de représenter deux isoformes différent par leur extrémité N-terminale. Pour ce faire, l'exon A codant pour 47 amino-acides est épissé en dehors du cadre de lecture, et conséquemment, la région protéique codante commence avec l'exon B. Néanmoins, il est également possible qu'il existe d'autres exons susceptibles d'être
20 transcrits dans d'autres tissus.

Egalement, l'intron de 8,7 kb (c'est-à-dire entre l'exon D et E) est susceptible de contenir une région promotrice qui peut conduire à des isoformes d'ICBP90 de poids moléculaires inférieurs à ceux observés dans les cellules Hela en prolifération (Figure 11B). De
25 manière intéressante, la spécificité tissulaire des différents ARN_m du récepteur aux œstrogènes est déterminée par différents promoteurs dont l'activité apparaît être altérée dans les lignées cellulaires du cancer du sein (Flouriot *et al.*, 1998).

30 L'ensemble de ces résultats suggère que le gène ICBP90 et la protéine ICBP90 présentent des caractéristiques communes avec

les membres de la famille du récepteur à l'acide rétinoïque, aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes en ce qui concerne les structures génique et protéique.

En effet, les inventeurs ont démontré expérimentalement, en 5 utilisant la technique du double hybride, l'existence d'interactions entre la protéine ICBP90 et TIP60 (Tat Interactive Protein, 60 kDa). La protéine TIP60 a été très récemment décrite comme étant un co-activateur du récepteur nucléaire, notamment le récepteur pour les androgènes (Brady ME *et al.*, 1999).

10 De ce fait, ICBP90 est susceptible de jouer le rôle d'un récepteur nucléaire sur lequel se lie un ligand endogène. Il est donc également dans la portée de la présente invention d'utiliser le polypeptide ICBP90 de l'invention pour isoler, cribler, identifier le ligand endogène. Il est également dans la portée de l'invention 15 d'utiliser le polypeptide ICBP90 de l'invention pour isoler, cribler, identifier des molécules naturelles ou de synthèse, biologique ou chimique, agoniste ou antagoniste de ce ligand naturel.

REFERENCES

Austin *et al.* (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1172, 283-291.

5 Banerji, J. *et al.* (1981), *Cell*, 27 : 299-308.

Barany, F. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 189-193.

Boritzki, T. J. *et al.* (1988), *Biochem. Pharmacol.*, 37, 4063-4068.

10

Brady, M. E. *et al.* (1999), *J. Biol. Chem.*, 274 : 17599-17604.

Brandt, T.L. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 6278-6284.

15 Brou, C. *et al.* (1993), *EMBO J.*, 12, 489-499.

Buckholz, R. G. (1993), *Curr. Op. Biotechnology*, 4, 538-542.

Burg, J.L. *et al.* (1996), *Mol. and Cell. Probes*, 10, 257-271.

20

Chu, B.C.F. *et al.* (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 5591-5603.

Chung, T.D.Y. *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9431-9435.

25

Darzynkiewicz *et al.* (1994), *Methods in Cells Biology*, 41, 421-435.

Deffie, A.M. *et al.* (1989), *Cancer Res.*, 49, 58-62.

De Vries, L. *et al.* (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11916-11920.

5 Devys *et al.* (1993), Nature Genet., 4, 335-340.

Drake, F. H. *et al.*, Biochemistry, 28, 8154-8160.

Duck, P. *et al.* (1990), Biotechniques, 9, 142-147.

10 Edwards, C.P. and Aruffo, A. (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 558-563.

Erlich, H.A. (1989), New York : Stockton Press.

15 Flouriot *et al.* (1998), Mol. Endocrinol., 12 : 1239-254.

Fry, A.M. *et al.* (1991), Cancer Res., 51, 6592-6595.

Furth *et al.* (1992), Anal. Biochem., 205 : 365.

20 Gaub, M.P. *et al.* (1998), J. Histochem Cytochem., 46, 1103-1111.

Goetz, J. *et al.* (1996), J. Biol. Chem., 271 : 29589-29598.

25 Goswami, P.C. *et al.* (1996), Mol. Cell. Biol., 16, 1500-1508.

Grandien (1996), Mol. Cell. Endocrinol., 116 : 207-212).

Griffin *et al.* (1999), Mol. Endocrinol. 13 : 1571-1587.

Gruba *et al.* (1998), *Cancer Res.*, 58 : 5267-5270.

Guatelli, J.C. *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1874-1878.

5 Guinee, D.G. *et al.* (1996), *Cancer*, 78, 729-735.

Haddad *et al.* (1988), *Human Genet.*, 103 : 619-625.

10 Heck, M.M. *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1086-1090.

Herzog, C.E. and Zwelling, L. A. (1997), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 608-612.

15 Hochhauser, D. *et al.* (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 18961 - 18965.

Hoglund *et al.* (1998), *Genes Chromosomes Cancer*, 21 : 8-16.

20 Hopfner *et al.* (2000), *Cancer Res.*, 60 : 121-128.

Hromas *et al.* (1996), *Curr. Top. Microbiol. Chem.*, 211 : 159-164.

Innis, M.A. *et al.* (1990), *Academic Press*.

25 Inouye, C. *et al.* (1994), *DNA Cell Biol.*, 13, 731-742.

Isaacs, R.J. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 121-137.

30 Isaacs, R.J. *et al.* (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 16741-16747.

Jenkins, J.R. *et al.* (1992), Nucleic Acids Res., 20, 5587-5592.

Kassel, O. *et al.* (1998), Mol. Pharmacol., 54, 1073-1079.

5 Kennerdell, J.R. and Carthew, R.W. (1998), Cell, 95, 1017-1026.

Kievitis, T. *et al.* (1991), J. Virol. Methods, 35, 273-286.

Kohler, G. *et al.* (1975), Nature, 256 (5517), 495-497.

10 Kubo, T. *et al.* (1995), Cancer Res., 55, 3860-3864.

Kwoh, D.Y. *et al.* (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177.

15 Landegren, U. *et al.* (1988), Science, 241, 1077-1080.

Lavie, J. *et al.* (1999), J. Biol. Chem., 274, 2308-2314.

20 Lee *et al.* (1998), Cancer Res., 58 : 1140-1143.

Lim, K. *et al.* (1998), Biochem. Mol. Biol. Int., 46, 35-42.

Lizardi, P.M. *et al.* (1988), Bio/technology, 6, 1197-1202.

25 Luckow, V.A. (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 564-572.

Martinez *et al.* (1997), Cancer Res., 57 : 1180-1187.

30 Matthews, J.A. *et al.* (1988), Anal. Biochem., 169 : 1-25.

Miele, E.A. *et al.* (1983), *J. Mol. Biol.*, 171 : 281-295.

Nagase *et al.* (1990), *J. Biol. Chem.*, 265 : 17300-17306.

5 Nitiss, J.L. (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 63-81.

Olins, P.O. and Lee, S.C. (1993), *Curr. Op. Biotechnology*, 4, 520-525.

10 Pommier, Y. *et al.* (1994), *Cancer Invest.*, 12, 530-542.

Ponglikitmongkol *et al.* (1988), *EMBO J.* 7 : 3385-3388.

Rio, M.C. *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9243-9247.

15 Qian *et al.* (1995), *Genomics*, 28 : 66-73.

Reese *et al.* (1996), Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Recognition. *Biocomputing* :

20 Proceedings of the 1996 Pacific Symposium. Edited by Lawrence Hunter and Terri E. World Scientific Singapore, 1996, January 27, 1996.

Rochette-Egly, C. *et al.* (1997), *Cell*, 90, 97-107.

25 Roskell, D.E. et Biddolph, S.C. (1999), *Eur. J. Med. Res.* 26, 105-106.

Rolfs, A. *et al.* (1991), Berlin : Springer-Verlag.

30

Sambrook, J. *et al.* (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sec. Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

5 Sandri, M.I. *et al.* (1996), Nucleic Acids Res., 24, 4464-4470.

Segev, D. (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

10 Sherer *et al.* (1991), Cancer Genet. Cytogenet., 57 : 169-173.

Stone, B.B. *et al.* (1996). Mol. and Cell. Probes, 10 : 359-370.

Tang *et al.* (1992), Nature, 356 : 152.

15

Taniwaki *et al.* (1996), Leuk. Lymphoma, 21 : 25-30.

Tsai-plugfelder, M. *et al.* (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7177-7181.

20

Walker, G.T. *et al.* (1992), Nucleic Acids Res., 20 : 1691-1696.

Wang, J.C. (1996), Ann. Rev. Biochem., 65, 635-692.

25 Wang, M.M. and Reed, R.R. (1993), Nature (London), 364, 121-126.

Yamazaki *et al.* (1996), Acta Oncol., 35, 417-423.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé dénommé ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein 90) de séquence d'acides aminés SEQ ID N°2.
5
2. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
 - a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 ;
 - 10 b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ;
 - c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b) et comportant au moins 80 % d'homologie, de préférence 90 % avec ledit polypeptide de a) ;
 - 15 d) un fragment d'au moins 5 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
 - e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).
- 20 3. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 caractérisé en ce qu'il est comporte au moins un domaine de fixation à l'ADN sélectionné dans le groupe composé d'un domaine « doigt de zinc » et d'un domaine « leucine zipper ».
- 25 4. Polypeptide selon la revendication 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN sur laquelle se lie ledit polypeptide est une boîte CCAAT, de préférence une boîte CCAAT inversée (Inverted CCAAT Box : ICB).

5. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide selon la revendication 1.

6. Polynucléotide selon la revendication 5 de séquence SEQ ID N°1.

5

7. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

10 a) un polynucléotide de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ou dont la séquence est celle de l'ARN correspondant à la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ;

b) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un polynucléotide défini en a),

15 c) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 80% d'homologie avec un polynucléotide défini en a) ou b),

d) un polynucléotide hybride dans des conditions de forte stringence avec une séquence de polynucléotide défini en a), b) ou c),

20 e) un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs, de préférence 21 nucléotides consécutifs, et de manière préférée 30 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini en a), b), c) ou d) à l'exception de l'EST humain AI 084 125, à l'exception de la séquence correspondant à la séquence SEQ ID N° 944 publiée le 5 août 1999 dans la demande de brevet WO 99 38972 et à l'exception des séquences SEQ ID N°9, N°10 et N°11 correspondant respectivement aux EST humains N° AI 083 773, N° AA 811 055, N° AA 488 755, N° AA 129 794 et N° AA 354 253.

8. Polynucléotide selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il est marqué directement ou indirectement par un composé radioactif ou un composé non radioactif.
- 5 9. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 8 en tant qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques.
- 10 10. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 8 en tant que sonde pour la détection de séquences nucléiques.
- 15 11. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 8 en tant que oligonucléotide sens ou antisens pour contrôler l'expression du produit protéique correspondant.
- 20 12. Vecteur recombinant de clonage d'un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 8 et/ou d'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il contient un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.
- 25 13. Vecteur selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comporte les éléments permettant l'expression éventuellement la sécrétion dudit polypeptide dans une cellule hôte.
- 25 14. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 12 à 13 caractérisé en ce que les éléments permettant l'expression dudit polypeptide sont choisis parmi :
 - a) le polynucléotide isolé de séquence SED ID N°12 ;
 - b) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de
- 30 la séquence du polynucléotide défini en a ;

- c) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 80% d'identité avec un polynucléotide défini en a) ou en b) ;
- d) un polynucléotide hybride dans des conditions de forte stringence avec une séquence du polynucléotide défini en a), b) ou 5 c).

- 15. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon l'une des revendications 12, 13 et 14.
- 10 16. Procédé de préparation d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule hôte selon la revendication 15 dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion dudit polypeptide recombinant et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
- 15 17. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 16.
- 18. Anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments caractérisé 20 en ce qu'il lie spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 et 17.
- 19. Anticorps monoclonal selon la revendication 18 spécifique de la protéine ICBP90 humaine et capable d'inhiber l'interaction entre 25 ICBP90 et la séquence d'ADN sur laquelle se lie spécifiquement la protéine ICBP90.
- 20. Anticorps monoclonal selon la revendication 18 spécifique de la protéine ICBP90 humaine et capable d'inhiber l'interaction entre 30 ICBP90 et des protéines avec lesquelles ICBP90 interagit, lesdites

protéines étant de préférence ICBP90 elle-même ou des protéines d'un complexe transcriptionnel.

21. Procédé de détection et/ou de dosage d'un polypeptide selon 5 l'une des revendications 1 à 4 et 17, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

10

22. Nécessaire pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 21 dans un échantillon biologique par réaction immunologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- 15 a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une des revendications 18 à 20 ;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit par la réaction immunologique.

20

23. Procédé de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 25 a) isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ;
- b) amplification spécifique de l'ADN à l'aide d'amorces selon la revendication 9 ;
- 30 c) analyse des produits d'amplification.

24. Nécessaire pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 23 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

5 a) un couple d'amorces nucléiques selon la revendication 9 ;
 b) les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
 c) éventuellement un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde selon la revendication 10.

10 25. Procédé de détection et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

15 a) Mise en contact d'une sonde selon la revendication 10 avec un échantillon biologique ;
 b) Détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'ADN de l'échantillon biologique.

20 26. Nécessaire pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 25 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

25 a) une sonde selon la revendication 10;
 b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation.

27. Procédé selon les revendications 21, 23 et 25 pour le diagnostic de prolifération cellulaire.

28. Procédé de criblage de ligand susceptible d'affecter l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le promoteur comporte des boîtes CCAAT et/ou CCAAT inversées (ICB) susceptibles de lier un polypeptide selon les revendications 1 à 4 et 17 et qui comporte les 5 étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs ligand(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction de transcription;
- b) détection et/ou mesure de l'activité transcriptionnelle.

10

29. Procédé de criblage de ligand susceptible d'affecter la fonction « récepteur nucléaire » du polypeptide selon les revendications 1 à 4 et 17 et qui comporte les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs ligands potentiels en présence de réactifs nécessaires ;
- b) détection et/ou mesure de l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le promoteur comporte des boîtes CCAAT et/ou CCAAT inversées (ICB) susceptible de lier ledit polypeptide.

20 30. Nécessaire pour la mise en œuvre d'un procédé selon les revendications 28 et 29 dans un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un polypeptide selon les revendications 1 à 4 et 17 ;
- b) un ligand ;
- c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction de transcription.

31. Ligand susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 28 ou 29.

30

32. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- a) un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17 ;
- b) un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 8 ;
- c) un vecteur selon l'une des revendications 12 à 14 ;
- 5 d) une cellule selon la revendication 15 ;
- e) un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20 ;
- f) un ligand selon la revendication 31

à titre de médicament.

10 33. Composé selon la revendication 32 à titre de médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

15 34. Utilisation d'un composé selon les revendications 32 et 33 pour la préparation d'un médicament destiné à moduler, à augmenter ou à diminuer la prolifération cellulaire.

20 35. Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif du cancer caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon l'une des revendications 32 et 33 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 36. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20 en tant qu'agent de ciblage conjugué à au moins un agent sélectionné parmi le groupe des agents antiprolifératifs, antinéoplastiques ou cytotoxiques.

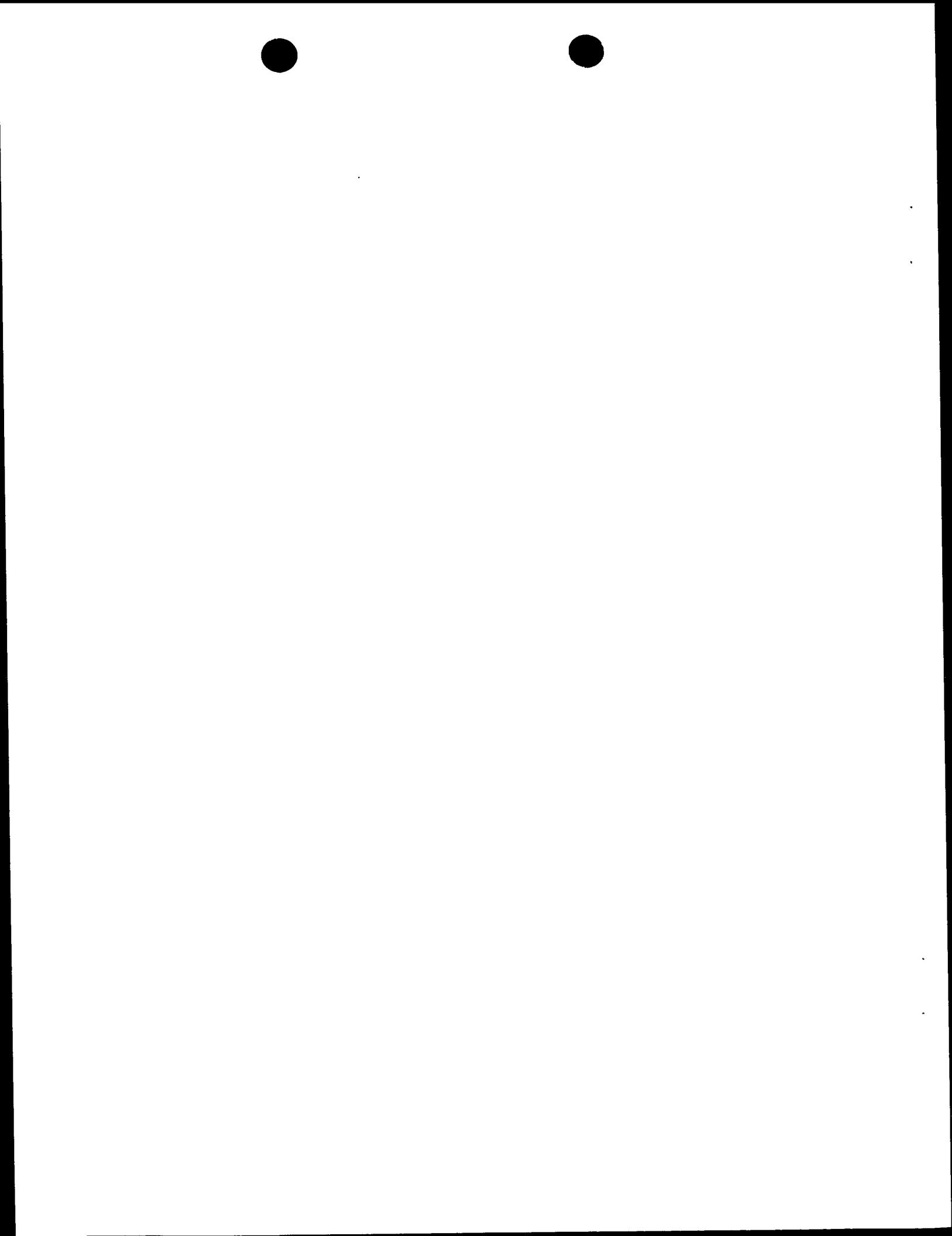
30 37. Produit comprenant au moins un composé selon les revendications 32 et 33 et au moins un autre agent anticancéreux

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie anti-cancéreuse.

38. Composition pour la détection, la localisation et l'imagerie des 5 cancers, comprenant un anticorps selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, l'anticorps est marqué directement ou indirectement avec un marqueur générateur de signal sélectionné parmi les isotopes radioactifs et les entités non isotopiques.

10 39. Méthode de détection, de localisation et d'imagerie du cancer, comprenant les étapes de:

- a) injection parentérale chez un être humain d'une composition selon la revendication 38 ;
- b) accumulation après un temps suffisant au niveau des 15 cellules cancéreuses de l'anticorps marqué puis pénétration de l'anticorps marqué à l'intérieur desdites cellules, sans que ledit anticorps ne se lie de manière substantielle aux cellules normales; et
- c) détection du signal au moyen d'un détecteur de signal; et
- d) conversion du signal détecté en une image des cellules 20 cancéreuses.



1 / 11

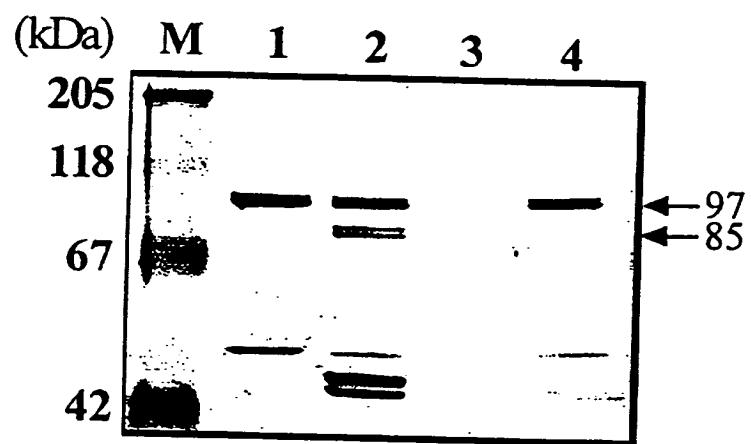
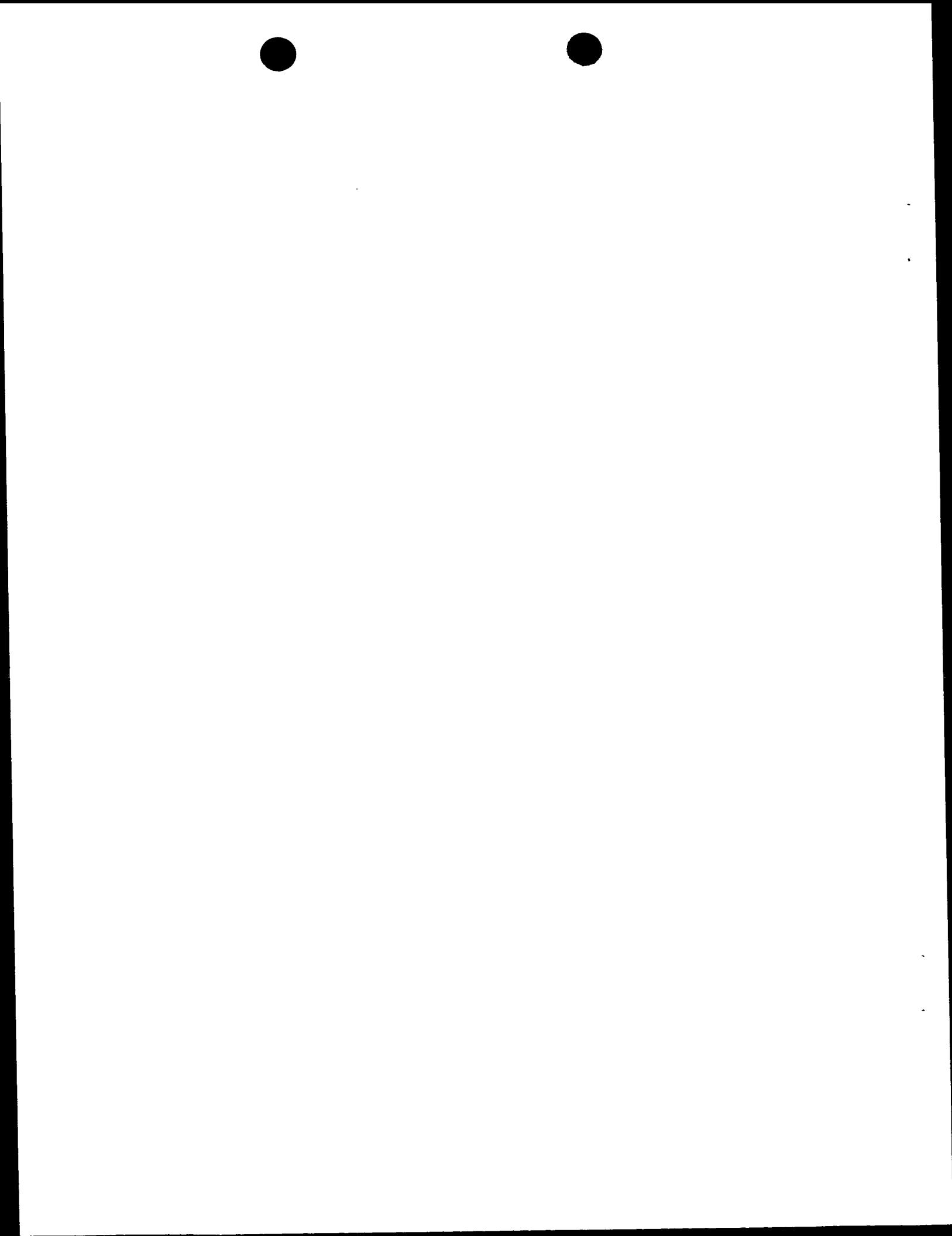


FIG. 1



2 / 11

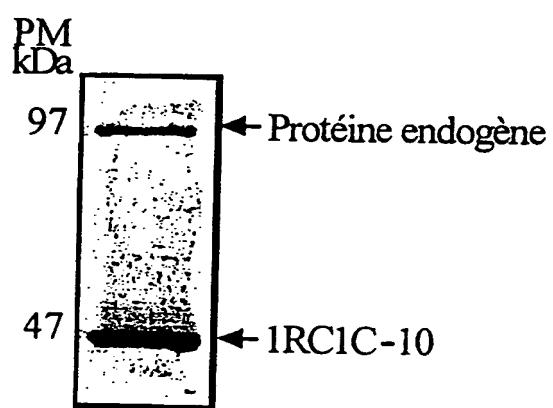


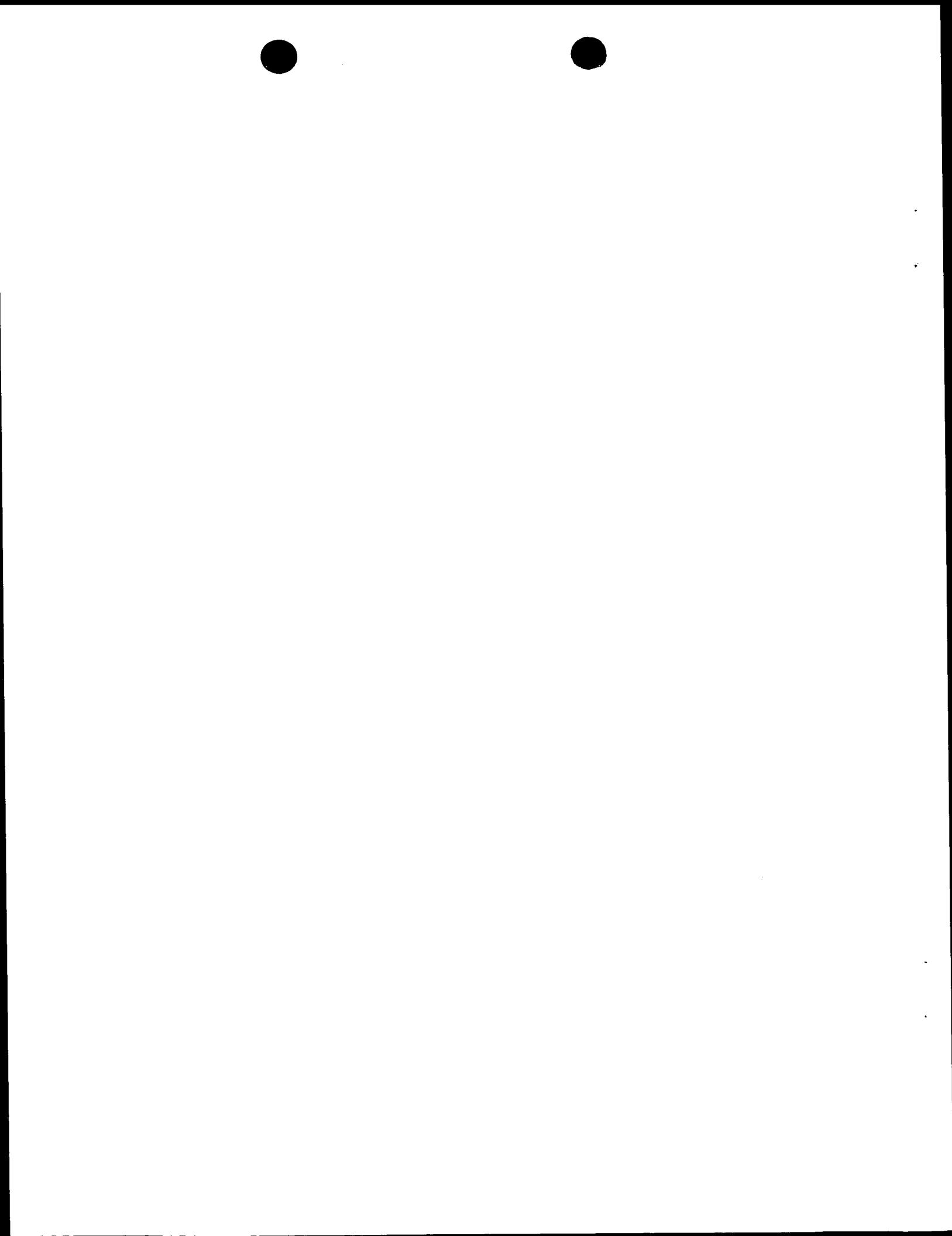
FIG. 2



3 / 11



FIG. 3



4 / 11

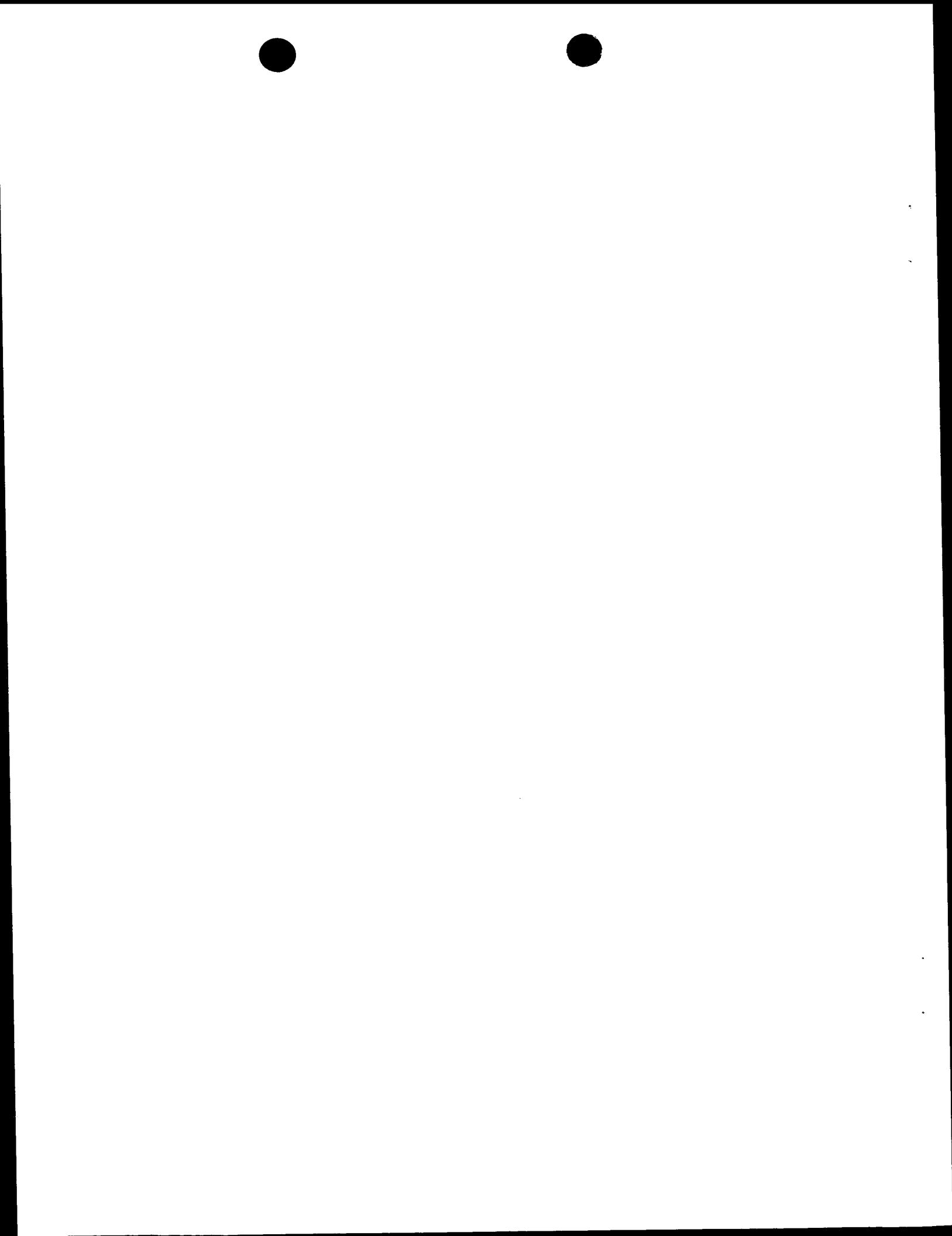


FIG. 4



5 / 11

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								
A	cerveau entier	amygdale	noyau caudé	cervelet	cortex cérébral	lobe frontal	hippo-campe	medulla oblongata
B	lobe occipital	putamen	substancia nigra	lobe temporal	thalamus	noyau sub-thalamique	moelle épinière	
C	coeur	aorte	muscle squelettique	colon	vessie	utérus	prostate	estomac
D	testicule	ovaire	pancréas	glande pituitaire	glande surrénale	glande thyroïde	glande salivaire	glande mammaire
E	rein	foie	intestin grêle	rate	thymus	leucocyte périphérique	ganglion lymphatique	moelle osseuse
F	appendice	poumon	trachée artère	placenta				
G	cerveau foetal	coeur foetal	rein foetal	foie foetal	rate foetale	thymus foetal	poumon foetal	
H	ARN total de levure 100 ng	ARNt de levure 100 ng	ARNr E. coli 100 ng	ADN E. coli 100 ng	Poly r(A) 100 ng	ADN ColI humain 100 ng	ADN humain 100 ng	ADN humain 500 ng



6 / 11

	10	20	30	40	50	60	70	80
1	ATGTTGGATCC	AGGTTGGAC	CATGGATGG	AGGCAGACCC	ACACGGCTGGA	CTCGCTGTC	AGGCTGACCA	AGGTGGAGGA
81	GCTGAGGGGG	AAGATCCAGG	AGCTGTTCCA	CGTGGAGCCA	GGCCTGGAGA	GGCTGTTCTA	CAGGGCAA	CAGATGGAGG
161	ACGGCCATAC	CCCTCTGAC	TACGAGGTC	GCTGAAATGA	CACCATCCAG	CTCCCTGGTC	GCCAGAGCC	CCTGCTCCCC
241	CACAGCACCA	AGGAGGGGA	CTCCGAGCTC	TCGGACACCG	ACTCCGGCTG	CTGGCTGGCC	CAGAGTGAGT	CAGACAAGTC
321	CTCCACCCAC	GGTGAAGCGG	CGCCCGAGAC	TGACAGGAGG	CCAGCGATG	AGGACATGTT	GGATGAGACG	GAATTGGGGC
401	TGTACAGGT	CAATGACTAC	GTCGATGTC	GGACACGAA	CATGGGGCG	TGGTTGAGG	CGCAGGTGGT	CAGGTGACG
481	CGGAAGGGCC	CCCTCCGGGA	CGAGGCTGTC	AGCTTCACTG	CCAGGGGGC	GCTGGAGGAG	GACGTCTATT	ACACGTGAA
561	ATACGAGAC	TACCCGGAGA	ACGGGGTGGT	CCAGATGAAC	TCCAGGGACG	TCCGAGGGCC	CGCCCGCACC	ATCATCAAGT
641	GGCAGGACCT	GGAGGTGGG	CAGGTGGTCA	TGCTCAACTA	CAACCCCGAC	AACCCCAAGG	AGCGGGGCTT	CTGGTACGAC
721	GCGGAGATCT	CCAGGAAGCC	CGAGACAGG	ACGGGGCGG	AACCTAAGC	CAACGTGGT	CTGGGGGATG	ATTCCTCTGAA
801	CGACTGTGG	ATCATCTTCG	TGGACGAAGT	CTTCAGGATT	GAGGGCGG	GTGAAGGGAG	CCCCATGGTT	GACAAACCCA
881	TGAGAOGGAA	GAGGGGGCG	TCCTGCAAGC	ACTGCAAGGA	CGACGTGAAC	AGACTCTGCA	GGGTCTGGCC	CTGGCCACCTG
961	TGCGGGGCC	GGCAGGACCC	CGACAAGCAG	CTCATGTCG	ATGAGTGGCA	CATGGGCTTC	CACATCTACT	GCCTGGACCC
1041	GCCCCCTACCC	AGTGTTCAC	GCGAGGACGA	GTGGTACTGC	CCTGAGTGGC	GGAAATGATGC	CAGGGGGCTG	GTACTGGGG
1121	GAGAGGGCT	GAGAGAGGC	AAGAAGATG	CGAAGATGGC	CTCGGGCACA	TGTCCTCAC	AGGGGGACTG	GGCAAGGGC
1201	ATGGCCGTGTG	TGGCCCGCAC	CAAGGAATGT	ACCATGTCAC	CGTCCAAACCA	CTACGGACCC	ATCCCCGGAA	TCCCCCGTGGG
1281	CACCATGTCG	CGGTTCCGAG	TCCAGGTCA	CGAGTGTGGT	GTCCATCGGC	CCACAGTGGC	TGGCATCCAT	GGCCGGAGCA
1361	ACGACGGATC	GTACTCCCTA	GTCCCTGGGG	GGGGCTATGA	GGATGATGTG	GACCATGGGA	ATTTTTTTCAC	ATACACGGGT
1441	AGTGGTGGTC	GAGATCTTTC	CGGCAACAAAG	AGGACCGGGG	AACAGTCITG	TGATCAGAAA	CTCACCAACA	CCAACAGGGC
1521	GCTGGCTCTC	AACTGCTTTG	CTCCCCATCAA	TGACCAAGAA	GGGGCCGAGG	CCAAGGACTG	GGGGTGGGG	AGGCCGGTCA
1601	GGGTGGTGGC	CAATGTCAAAG	GGTGGCAAGA	ATAGCAAGT	GGCCCCGGT	GAGGGCAAC	GCTACCATGG	CATCTACAAG
1681	GTTGTGAAT	ACTGGCCCGA	GAAGGGGAAG	TCCGGGTTTC	TCTGGTGGG	CTACCTCTG	CGGAGGGACG	ATGATGAGCC
1761	TGGCCCTTGG	ACGAAGGAGG	GGAAAGGACCG	GATCAAGAAG	CTGGGGCTGA	CCATGGCACTA	TCCAGAAGGC	TACCTGGAA
1841	CCCTGGCAA	CCGAGGAGGA	GAGAAGGAGA	ACAGCAAGAG	GGGGAGGAG	GAGCAGGAGG	AGGGGGCTT	CGGGTCCCCC
1921	AGGACGGGCA	AGGGCAAGTG	GAAGGGGAAG	TGGGCAGGGAG	GTGGCCGGAG	CAGGGCCGGG	TCCCCGGCC	GGACATCCAA
2001	GAACACCAAG	GTGGAGCCCT	ACAGTCITCA	GGCCCAGGAG	AGCAGCTCA	TCAAGAGGAA	CAAGAGCAAC	GCAGAGCTGT
2081	GGAATGAGGT	CCTGGCGTCA	CTCAAGGACC	GGCCGGGGAGG	CGGCAAGCCC	TICCACTGTT	TCTTGTGAGTAA	AGTGGAGGG
2161	ACGTTCCAGT	GTATCTGCTG	TCAGGAGCTG	GTGGTCCGGC	CCATCAGAC	CGTGTGGCA	CACAAGGTGT	GCAGGGACTG
2241	CCTGGACAGA	TCCTTTGGGG	CACAGTGTGTT	CAGGTGGCT	GCCTGCGGCT	ACGACCTGGG	CGCGAGCTAT	GCATGAGGG
2321	TGAACCAAGCC	TCTGCAAGACC	GTCCTCAACC	AGCTCTTCCC	CGGCTACGGC	ATGGCCGGT	GA	2382

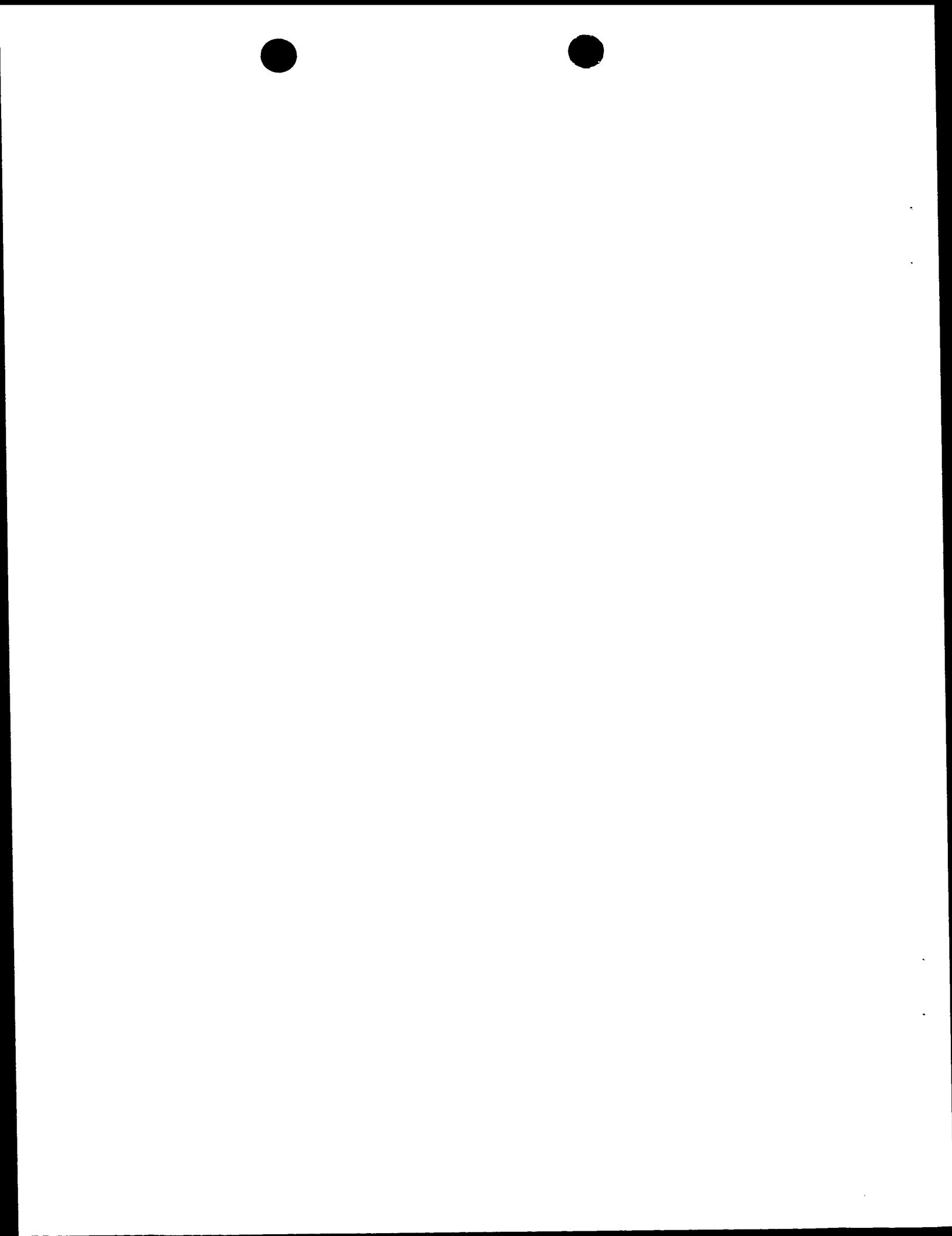
FIG-6



7 / 11

1	MWIQVRTMDG	RQTHTVDSL	RTKVEELRR	KIQELFHVEP	GLQRLFYRGK	QMEGDGHTLFD	YEVRLNDTIQ	LLVRQSLVLP	80
81	HSTKERDSEL	SDTDSGGCLG	QSESDKSSTH	GEAAETDSR	PADEDWDET	ELGLYKVNEY	VDARDTNMGA	WFEAQVVRVT	160
161	RKAPSREPC	SSTSRRPALEE	DVIYHVYDD	YFENGVYQMN	SRDVRAFART	IIKWQDLEVG	QVVMLYNNPD	NPKERGFWD	240
241	AEISRKRETR	TARELYANVV	LGDDSLNDCR	IIIFVDEVFKI	ERPGEGPSMV	DNPMPRRKSGP	SCKHCKRDVN	RLCRVCACHL	320
321	CGGRQDPDKQ	LMCDECDMAF	HIYCLDPPLS	SVPSEDEWYC	PECRNDASEV	VLAGERLRES	KNAKMASAT	SSSQRDWGKG	400
401	MACVGRTRKEC	TIVPSNHYGP	IPGIPVGTMW	RFRVQVSESG	VHRPHVAGIH	GRSNDGSYSL	VLAGGYEDDV	DHGNNFTTYG	480
481	SGGRDLSCGNK	RTAEQSCDQK	LTNTNRAAL	NCFAPINDQE	GAEAKDWRSQ	KPVRRVVRNPK	GGKNSKYAPA	EGNRYDGIYK	560
561	VVKYWPERGR	SGFLWRYLL	RRDDDEFGPW	TKEGKDRIKK	LGLTMQYPEG	YLEALANRER	EKENSKREEE	EQQEGGFASP	640
641	RTGKGKWRK	SAGGGPSRAG	SPRRTSRTK	VEPYSLTAQQ	SSLIREDSN	AKLNEVLAS	LKDRPASGSP	FQLFLSKVEE	720
721	TFQCCQEL	VFRPITTCVQ	HNVCRDCLDR	SFRAQVFSCP	ACRYDLGRSY	AMQVNQPLQT	VLNQLPFGYQ	NGR*	794
	10	20	30	40	50	60	70	80	

FIG_7



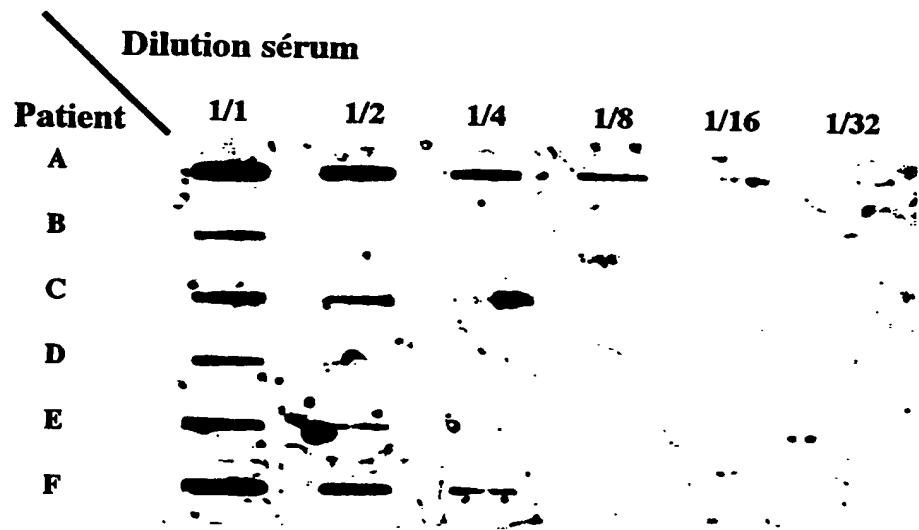
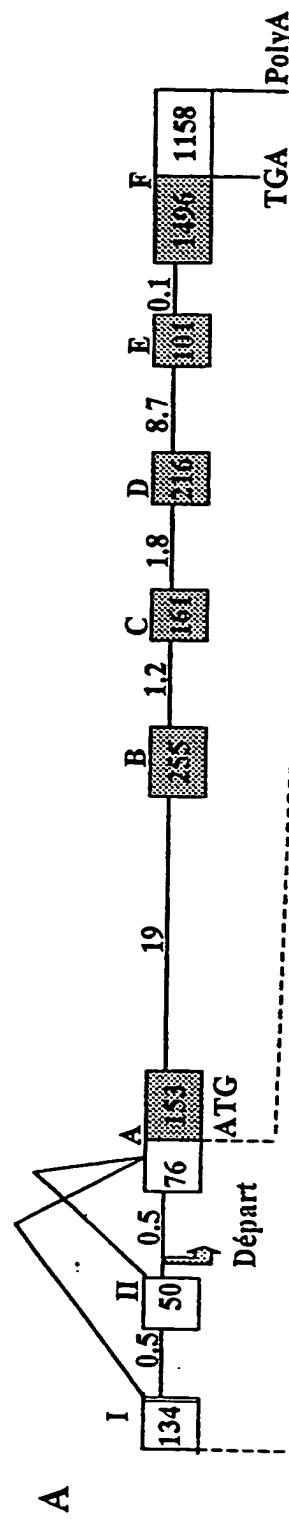


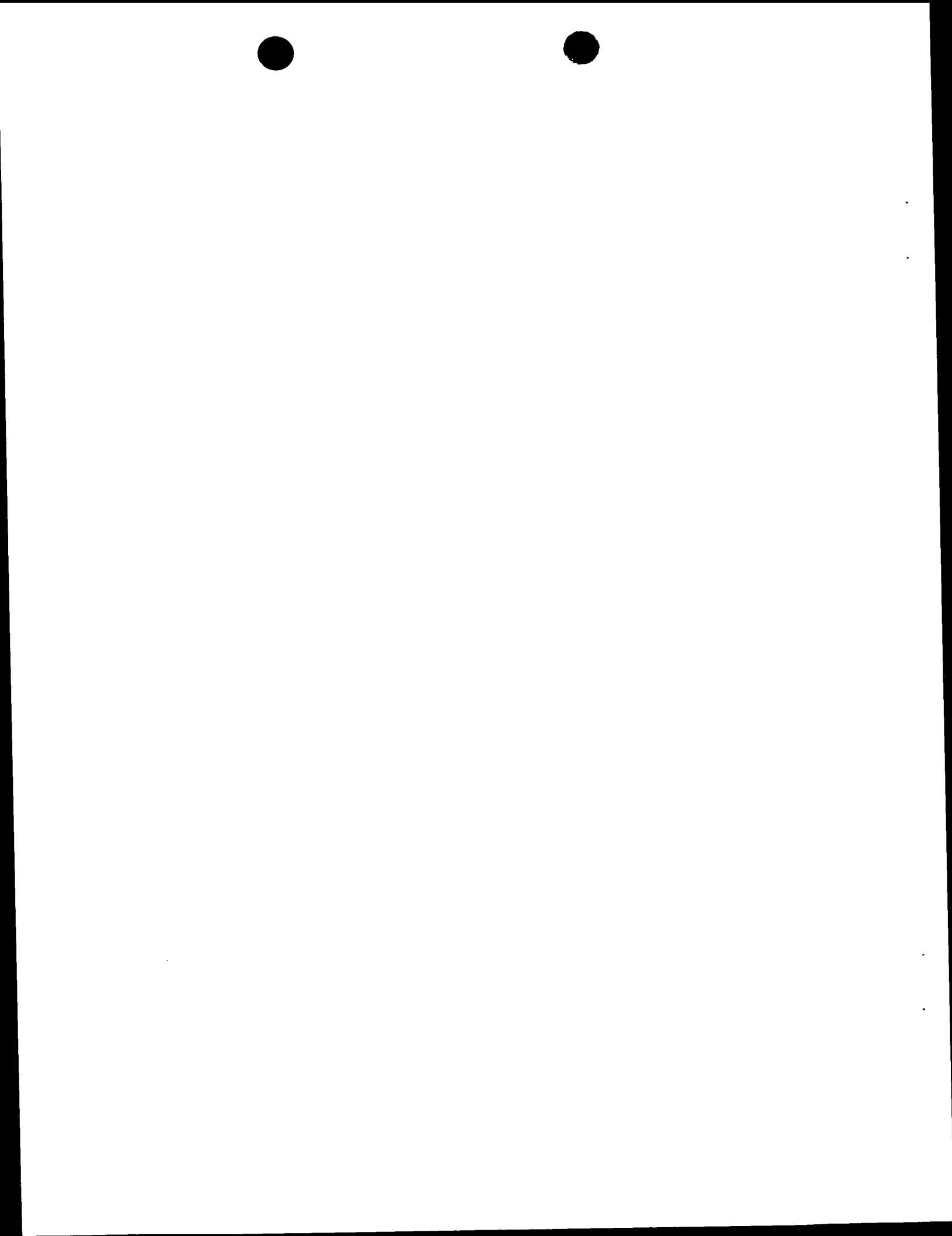
FIG-8



FIG-9



1 GGCAGGGTTT GCGAGGGGG CGCTCCGGGT CGCAAGCAAG TCCGGCGGG
 101 GCAGGCAGAC AACGTGTTCG CGGGACCGG AGAGgtgagc gg&ggccg GC4
 201 aactttcccg cqcgccagc cgggcccac gcatgtcccg cactctgtcc
 301 cacacatccg qctggagccg ggaccaggcgc tgccgtccccq gaacctcccg
 401 atgttagctt ccccgccgtgc gcgccggggcg ccccgccgtgc aattgtcyc
 501 atgggagcg aqgggggggg ggccgggggggg tgctqggag ccataaaag
 601 agtcccgccg qcggggggtgg gctggggctc gctgggggggg
 701 GAGCTGCCG GGGTGGAGG TCGAGgtgag tcgcggggcg cgcgcgtcg
 801 agtcggccac gcgccgggg 9ggggccggca aggggggggg
 901 tggacttgg ttaagtcccc cccgggacctt ctgaagtccc ggccccggct
 1001 aatcatgaa tgaatgaaata aacgaaacaa ctcgccac ttggccgggg
 1101 ctttttttc aattcccttc ttccatttc aatcttcaac
 1201 tggccagggt ctggctgtac agggggactg gaaggggactg
 1301 CATGGCTCAG AGGTGCTGGT AAAACTGATG GGGTTTATG CTGTCCTCC
 CCTCAGGGCC GACCCATG 1369



10 / 11

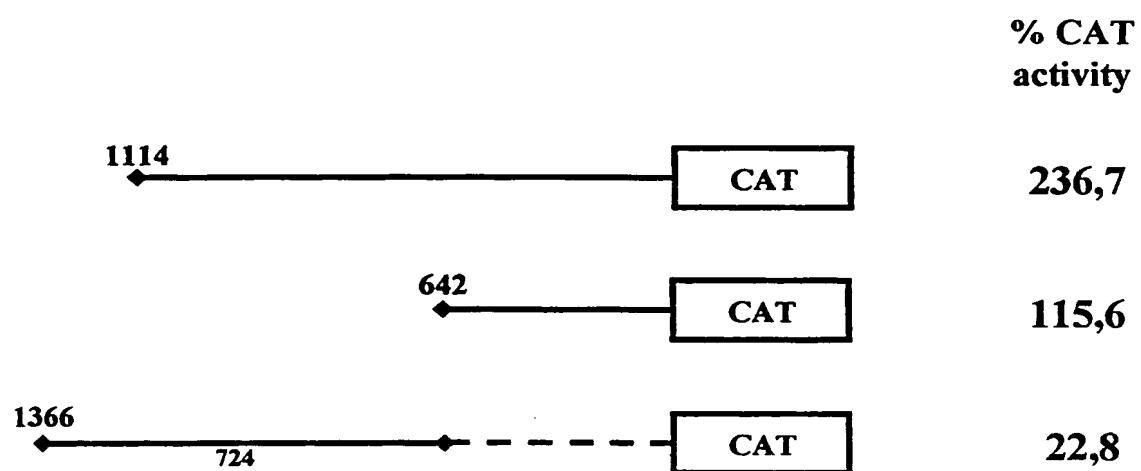


FIG 10

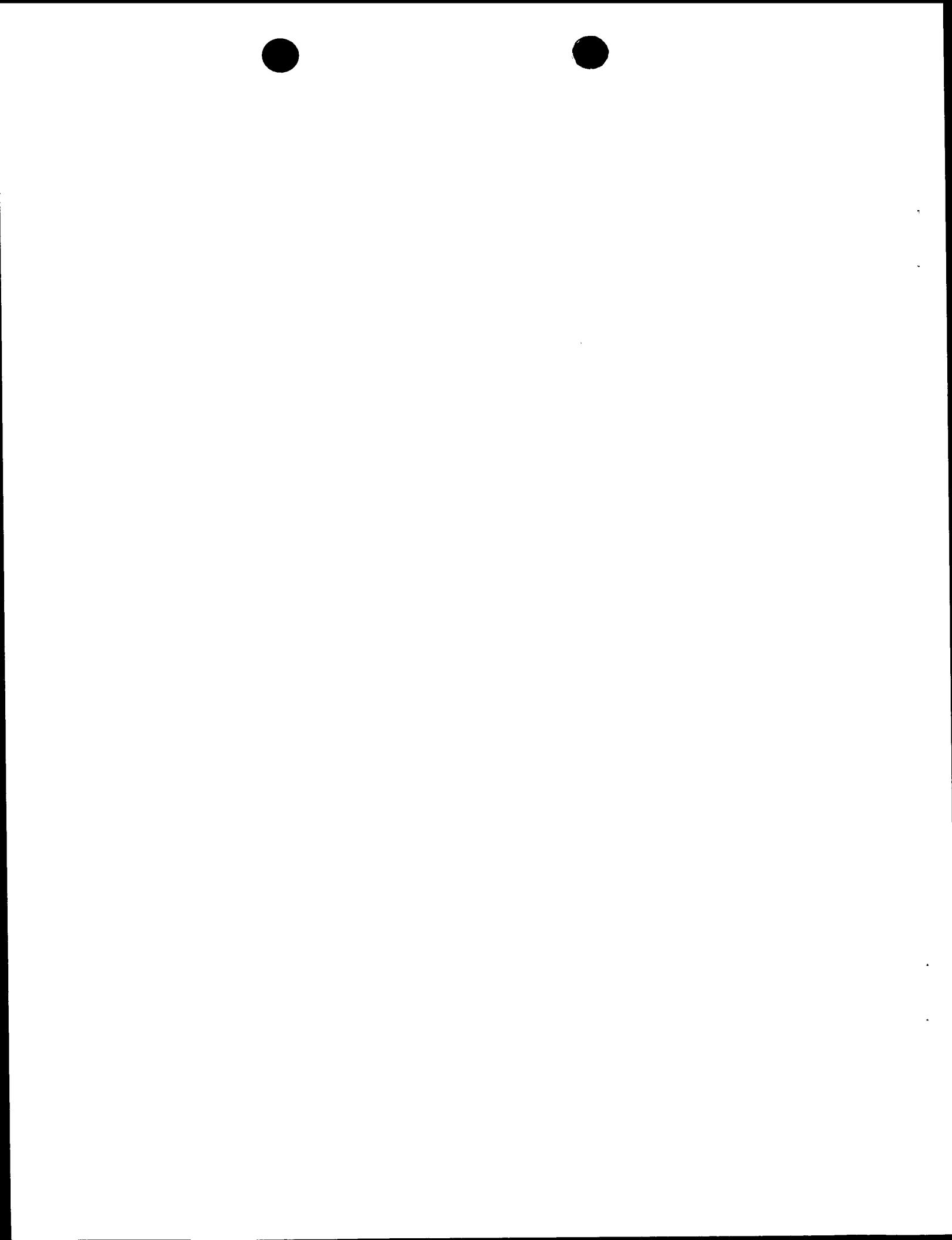


FIG-11A

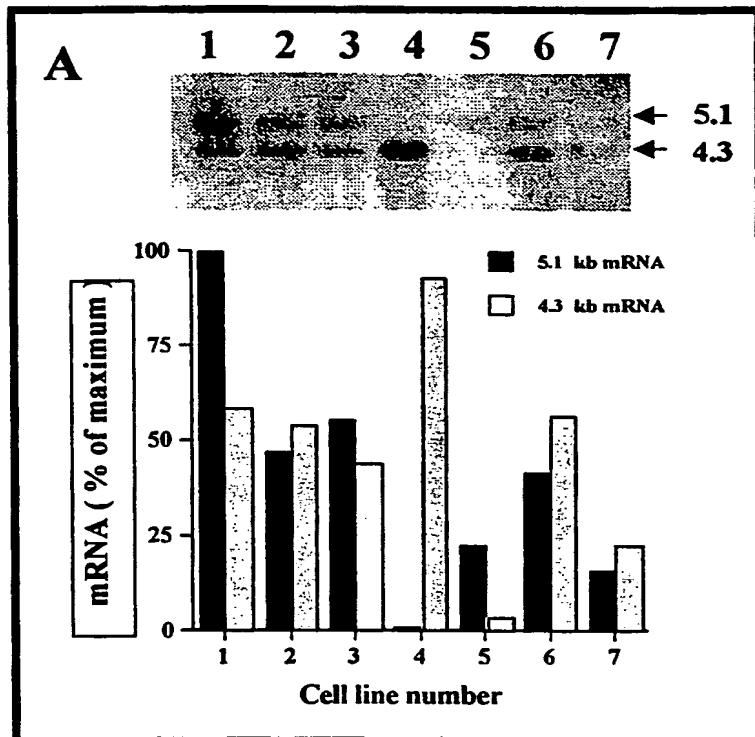
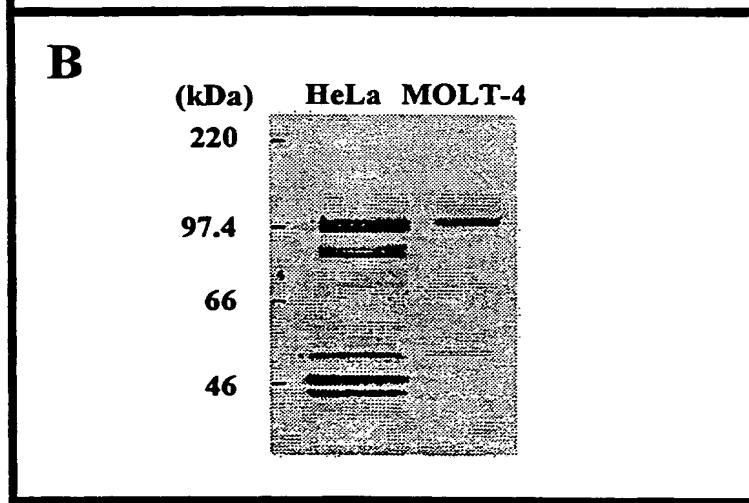


FIG-11B





LISTE DE SEQUENCES

<110> ADEREGEM

<120> Polypeptide ICBP90 et ses fragments et polynucléotides codant lesdits polypeptides et applications au diagnostic et au traitement du cancer

<130> d18243

<140>
<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2382

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2382)

<400> 1

atg tgg atc cag gtt cg^g acc atg gat g^{gg} g^{gg} a^{gg} c^{ag} a^{cc} c^{ac} a^{cg} g^{tg} 48
Met Trp Ile Gln Val Arg Thr Met Asp Gly Arg Gln Thr His Thr Val
1 5 10 15

gac tcg ctg tcc agg ctg acc aag gtg gag gag ctg agg cg ^g aag atc	96	
Asp Ser Leu Ser Arg Leu Thr Lys Val Glu Glu Leu Arg Arg Lys Ile		
20	25	30

cag gag ctg ttc cac gtg gag cca ggc ctg cag agg ctg ttc tac agg 144
 Gln Glu Leu Phe His Val Glu Pro Gly Leu Gln Arg Leu Phe Tyr Arg
 35 40 45

```

ggc aaa cag atg gag gac ggc cat acc ctc ttc gac tac gag gtc cgc 192
Gly Lys Gln Met Glu Asp Gly His Thr Leu Phe Asp Tyr Glu Val Arg
      50          55          60

```

ctg aat gac acc atc cag ctc ctg gtc cgc cag agc ctc gtg ctc ccc 240
 Leu Asn Asp Thr Ile Gln Leu Leu Val Arg Gln Ser Leu Val Leu Pro
 65 70 75 80

cac agc acc aag gag cg^g gac tcc gag ctc tcc gac acc gac tcc ggc 288
 His Ser Thr Lys Glu Arg Asp Ser Glu Leu Ser Asp Thr Asp Ser Gly
 85 90 95

tgc tgc ctg ggc cag agt gag tca gac aag tcc tcc acc cac ggt gag	336
Cys Cys Leu Gly Gln Ser Glu Ser Asp Lys Ser Ser Thr His Gly Glu	
100 105 110	

```

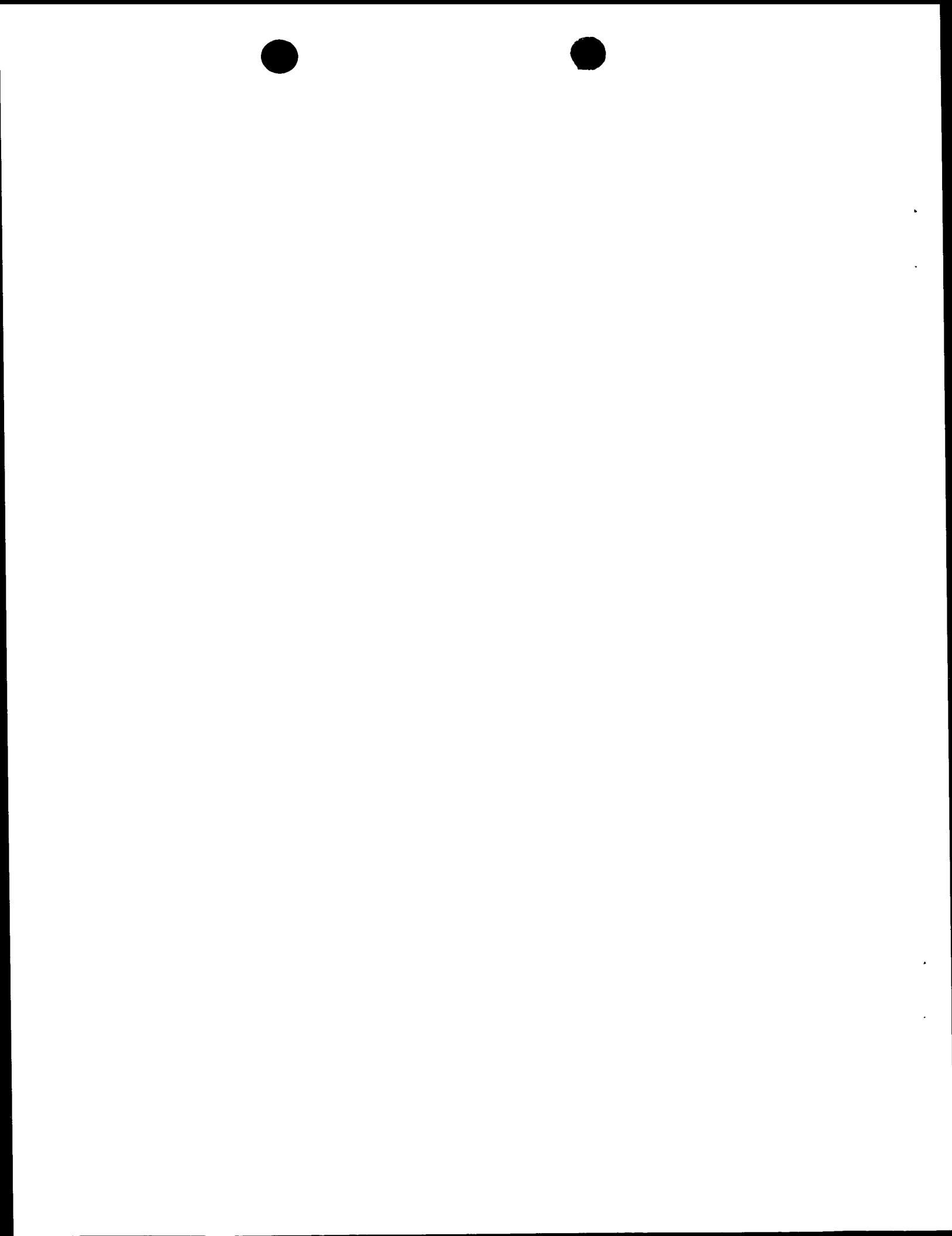
gcg gcc gcc gag act gac agc agg cca gcc gat gag gac atg tgg gat 384
Ala Ala Ala Glu Thr Asp Ser Arg Pro Ala Asp Glu Asp Met Trp Asp
115          120          125

```

gag acg gaa ttg ggg ctg tac aag gtc aat gag tac gtc gat gct cgg 432
 Glu Thr Glu Leu Gly Leu Tyr Lys Val Asn Glu Tyr Val Asp Ala Arg



130	135	140	
gac acg aac atg ggg gcg tgg ttt gag gcg cag gtg gtc agg gtg acg Asp Thr Asn Met Gly Ala Trp Phe Glu Ala Gln Val Val Arg Val Thr 145 150 155 160			
cg ^g aag gcc ccc tcc cg ^g gac gag ccc tgc agc tcc acg tcc agg cc ^g Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asp Glu Pro Cys Ser Ser Thr Ser Arg Pro 165 170 175 528			
gc ^g ctg gag gag gac gtc att tac cac gtg aaa tac gac gac tac cc ^g Ala Leu Glu Glu Asp Val Ile Tyr His Val Lys Tyr Asp Asp Tyr Pro 180 185 190 576			
gag aac ggc gt ^g gtc cag atg aac tcc agg gac gtc cga gc ^g cgc gc ^g Glu Asn Gly Val Val Gln Met Asn Ser Arg Asp Val Arg Ala Arg Ala 195 200 205 624			
cg ^c acc atc atc aag tgg cag gac ctg gag gt ^g ggc cag gt ^g gtc atg Arg Thr Ile Ile Lys Trp Gln Asp Leu Glu Val Gly Gln Val Val Met 210 215 220 672			
ctc aac tac aac ccc gac aac ccc aag gag cg ^g ggc ttc tgg tac gac Leu Asn Tyr Asn Pro Asp Asn Pro Lys Glu Arg Gly Phe Trp Tyr Asp 225 230 235 240 720			
gc ^g gag atc tcc agg aag cg ^c gag acc agg acg gc ^g cgg gaa ctc tac Ala Glu Ile Ser Arg Lys Arg Glu Thr Arg Thr Ala Arg Glu Leu Tyr 245 250 255 768			
gc ^c aac gt ^g gt ^g ctg ggg gat gat tct ctg aac gac tgt cgg atc atc Ala Asn Val Val Leu Glu Asp Asp Ser Leu Asn Asp Cys Arg Ile Ile 260 265 270 816			
ttc gt ^g gac gaa gt ^c ttc aag att gag cg ^g cc ^g ggt gaa ggg agc cc ^g Phe Val Asp Glu Val Phe Lys Ile Glu Arg Pro Gly Glu Gly Ser Pro 275 280 285 864			
atg gtt gac aac ccc atg aga cg ^g aag agc ggg cc ^g tcc tgc aag cac Met Val Asp Asn Pro Met Arg Arg Lys Ser Gly Pro Ser Cys Lys His 290 295 300 912			
tgc aag gac gac gt ^g aac aga ctc tgc agg gtc tgc gcc tgc cac ctg Cys Lys Asp Asp Val Asn Arg Leu Cys Arg Val Cys Ala Cys His Leu 305 310 315 320 960			
tgc ggg ggc cg ^g cag gac ccc gac aag gag ctc atg tgc gat gag tgc Cys Gly Arg Gln Asp Pro Asp Lys Gln Leu Met Cys Asp Glu Cys 325 330 335 1008			
gac atg gcc ttc cac atc tac tgc ctg gac cc ^g ccc ctc agc agt gtt Asp Met Ala Phe His Ile Tyr Cys Leu Asp Pro Pro Leu Ser Ser Val 340 345 350 1056			
ccc agc gag gac gag tgg tac tgc cct gag tgc cc ^g aat gat gcc agc Pro Ser Glu Asp Glu Trp Tyr Cys Pro Glu Cys Arg Asn Asp Ala Ser 355 360 365 1104			
gag gt ^g gta ctg gc ^g gga gag cg ^g ctg aga gag agc aag aag aat gc ^g Glu Val Val Leu Ala Gly Glu Arg Leu Arg Glu Ser Lys Lys Asn Ala 370 375 380 1152			



3

aag atg gcc tcg gcc aca tcg tcc tca cag cgg gac tgg ggc aag ggc 1200
 Lys Met Ala Ser Ala Thr Ser Ser Ser Gln Arg Asp Trp Gly Lys Gly
 385 390 395 400

 atg gcc tgt gtg ggc cgc acc aag gaa tgt acc atc gtc ccg tcc aac 1248
 Met Ala Cys Val Gly Arg Thr Lys Glu Cys Thr Ile Val Pro Ser Asn
 405 410 415

 cac tac gga ccc atc ccg ggg atc ccc gtg ggc acc atg tgg cgg ttc 1296
 His Tyr Gly Pro Ile Pro Gly Ile Pro Val Gly Thr Met Trp Arg Phe
 420 425 430

 cga gtc cag gtc agc gag tcg ggt gtc cat cgg ccc cac gtg gct ggc 1344
 Arg Val Gln Val Ser Glu Ser Gly Val His Arg Pro His Val Ala Gly
 435 440 445

 atc cat ggc cgg agc aac gac gga tcg tac tcc cta gtc ctg gcg ggg 1392
 Ile His Gly Arg Ser Asn Asp Gly Ser Tyr Ser Leu Val Leu Ala Gly
 450 455 460

 ggc tat gag gat gat gtg gac cat ggg aat ttt ttc aca tac acg ggt 1440
 Gly Tyr Glu Asp Asp Val Asp His Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Thr Gly
 465 470 475 480

 agt ggt ggt cga gat ctt tcc ggc aac aag agg acc gcg gaa cag tct 1488
 Ser Gly Gly Arg Asp Leu Ser Gly Asn Lys Arg Thr Ala Glu Gln Ser
 485 490 495

 tgt gat cag aaa ctc acc aac acc aac agg gcg ctg gct ctc aac tgc 1536
 Cys Asp Gln Lys Leu Thr Asn Thr Asn Arg Ala Leu Ala Leu Asn Cys
 500 505 510

 ttt gct ccc atc aat gac caa gaa ggg gcc gag gcc aag gac tgg cgg 1584
 Phe Ala Pro Ile Asn Asp Gln Glu Gly Ala Glu Ala Lys Asp Trp Arg
 515 520 525

 tcg ggg aag ccg gtc agg gtg gtg cgc aat gtc aag ggt ggc aag aat 1632
 Ser Gly Lys Pro Val Arg Val Val Arg Asn Val Lys Gly Gly Lys Asn
 530 535 540

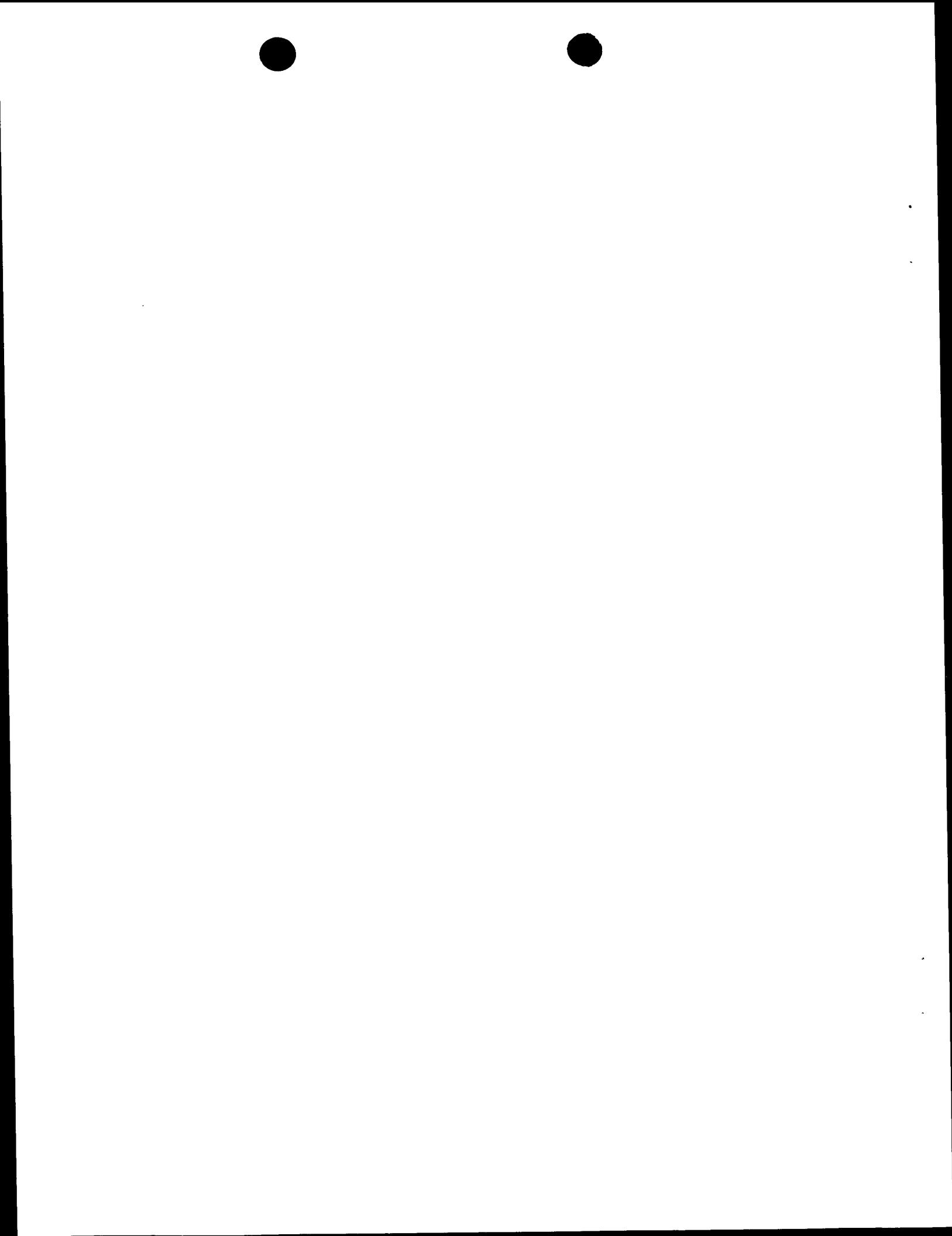
 agc aag tac gcc ccc gct gag ggc aac cgc tac gat ggc atc tac aag 1680
 Ser Lys Tyr Ala Pro Ala Glu Gly Asn Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Lys
 545 550 555 560

 gtt gtg aaa tac tgg ccc gag aag ggg aag tcc ggg ttt ctc gtg tgg 1728
 Val Val Lys Tyr Trp Pro Glu Lys Gly Lys Ser Gly Phe Leu Val Trp
 565 570 575

 cgc tac ctt ctg cgg agg gac gat gat gag cct ggc cct tgg acg aag 1776
 Arg Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Asp Asp Glu Pro Gly Pro Trp Thr Lys
 580 585 590

 gag ggg aag gac cgg atc aag aag ctg ggg ctg acc atg cag tat cca 1824
 Glu Gly Lys Asp Arg Ile Lys Lys Leu Gly Leu Thr Met Gln Tyr Pro
 595 600 605

 gaa ggc tac ctg gaa gcc ctg gcc aac cga gag cga gag aag gag aac 1872
 Glu Gly Tyr Leu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Glu Arg Glu Lys Glu Asn
 610 615 620



agc aag agg gag gag gag cag cag gag ggg ggc ttc gcg tcc ccc 1920
 Ser Lys Arg Glu Glu Glu Glu Gln Gln Glu Gly Gly Phe Ala Ser Pro
 625 630 635 640

 agg acg ggc aag ggc aag tgg aag cgg aag tcg gca gga ggt ggc ccg 1968
 Arg Thr Gly Lys Gly Lys Trp Lys Arg Lys Ser Ala Gly Gly Pro
 645 650 655

 agc agg gcc ggg tcc ccg cgc cgg aca tcc aag aaa acc aag gtg gag 2016
 Ser Arg Ala Gly Ser Pro Arg Arg Thr Ser Lys Lys Thr Lys Val Glu
 660 665 670

 ccc tac agt ctc acg gcc cag cag agc agc ctc atc aga gag gac aag 2064
 Pro Tyr Ser Leu Thr Ala Gln Gln Ser Ser Leu Ile Arg Glu Asp Lys
 675 680 685

 agc aac gcc aag ctg tgg aat gag gtc ctg gcg tca ctc aag gac cgg 2112
 Ser Asn Ala Lys Leu Trp Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Lys Asp Arg
 690 695 700

 ccg gcg agc ggc agc ccg ttc cag ttg ttc ctg agt aaa gtg gag gag 2160
 Pro Ala Ser Gly Ser Pro Phe Gln Leu Phe Leu Ser Lys Val Glu Glu
 705 710 715 720

 acg ttc cag tgt atc tgc tgt cag gag ctg gtg ttc cgg ccc atc acg 2208
 Thr Phe Gln Cys Ile Cys Cys Gln Glu Leu Val Phe Arg Pro Ile Thr
 725 730 735

 acc gtg tgc cag cac aac gtg tgc aag gac tgc ctg gac aga tcc ttt 2256
 Thr Val Cys Gln His Asn Val Cys Lys Asp Cys Leu Asp Arg Ser Phe
 740 745 750

 cgg gca cag gtg ttc agc tgc cct gcc tgc cgc tac gac ctg ggc cgc 2304
 Arg Ala Gln Val Phe Ser Cys Pro Ala Cys Arg Tyr Asp Leu Gly Arg
 755 760 765

 agc tat gcc atg cag gtg aac cag cct ctg cag acc gtc ctc aac cag 2352
 Ser Tyr Ala Met Gln Val Asn Gln Pro Leu Gln Thr Val Leu Asn Gln
 770 775 780

 ctc ttc ccc ggc tac ggc aat ggc cgg tga 2382
 Leu Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Arg
 785 790

<210> 2
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Trp Ile Gln Val Arg Thr Met Asp Gly Arg Gln Thr His Thr Val
 1 5 10 15

Asp Ser Leu Ser Arg Leu Thr Lys Val Glu Glu Leu Arg Arg Lys Ile
 20 25 30

Gln Glu Leu Phe His Val Glu Pro Gly Leu Gln Arg Leu Phe Tyr Arg
 35 40 45

Gly Lys Gln Met Glu Asp Gly His Thr Leu Phe Asp Tyr Glu Val Arg



50 55 60

Leu Asn Asp Thr Ile Gln Leu Leu Val Arg Gln Ser Leu Val Leu Pro
65 70 75 80

His Ser Thr Lys Glu Arg Asp Ser Glu Leu Ser Asp Thr Asp Ser Gly
85 90 95

Cys Cys Leu Gly Gln Ser Glu Ser Asp Lys Ser Ser Thr His Gly Glu
100 105 110

Ala Ala Ala Glu Thr Asp Ser Arg Pro Ala Asp Glu Asp Met Trp Asp
115 120 125

Glu Thr Glu Leu Gly Leu Tyr Lys Val Asn Glu Tyr Val Asp Ala Arg
130 135 140

Asp Thr Asn Met Gly Ala Trp Phe Glu Ala Gln Val Val Arg Val Thr
145 150 155 160

Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asp Glu Pro Cys Ser Ser Thr Ser Arg Pro
165 170 175

Ala Leu Glu Glu Asp Val Ile Tyr His Val Lys Tyr Asp Asp Tyr Pro
180 185 190

Glu Asn Gly Val Val Gln Met Asn Ser Arg Asp Val Arg Ala Arg Ala
195 200 205

Arg Thr Ile Ile Lys Trp Gln Asp Leu Glu Val Gly Gln Val Val Met
210 215 220

Leu Asn Tyr Asn Pro Asp Asn Pro Lys Glu Arg Gly Phe Trp Tyr Asp
225 230 235 240

Ala Glu Ile Ser Arg Lys Arg Glu Thr Arg Thr Ala Arg Glu Leu Tyr
245 250 255

Ala Asn Val Val Leu Gly Asp Asp Ser Leu Asn Asp Cys Arg Ile Ile
260 265 270

Phe Val Asp Glu Val Phe Lys Ile Glu Arg Pro Gly Glu Gly Ser Pro
275 280 285

Met Val Asp Asn Pro Met Arg Arg Lys Ser Gly Pro Ser Cys Lys His
290 295 300

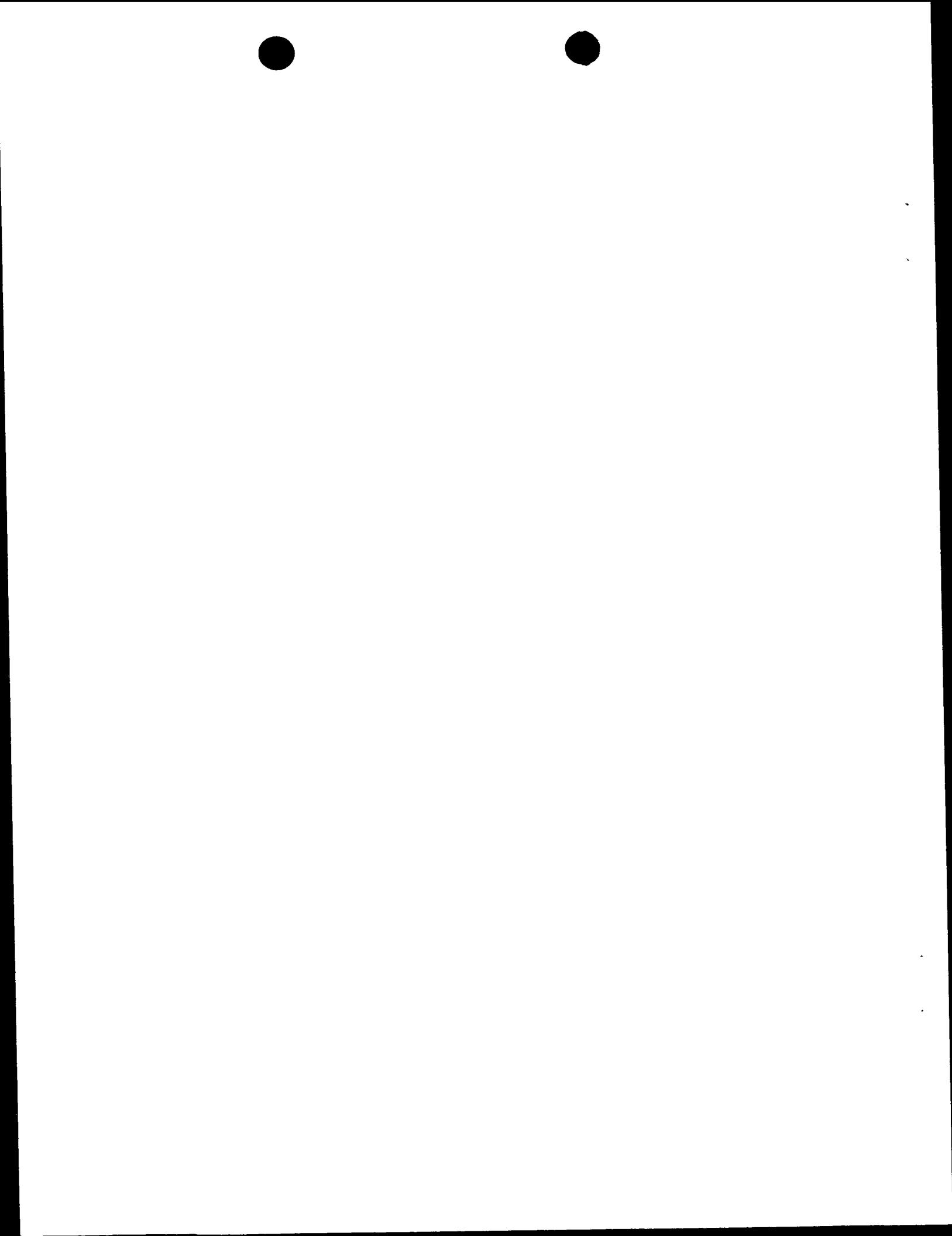
Cys Lys Asp Asp Val Asn Arg Leu Cys Arg Val Cys Ala Cys His Leu
305 310 315 320

Cys Gly Gly Arg Gln Asp Pro Asp Lys Gln Leu Met Cys Asp Glu Cys
325 330 335

Asp Met Ala Phe His Ile Tyr Cys Leu Asp Pro Pro Leu Ser Ser Val
340 345 350

Pro Ser Glu Asp Glu Trp Tyr Cys Pro Glu Cys Arg Asn Asp Ala Ser
355 360 365

Glu Val Val Leu Ala Gly Glu Arg Leu Arg Glu Ser Lys Lys Asn Ala
370 375 380



Lys Met Ala Ser Ala Thr Ser Ser Ser Gln Arg Asp Trp Gly Lys Gly
385 390 395 400

Met Ala Cys Val Gly Arg Thr Lys Glu Cys Thr Ile Val Pro Ser Asn
405 410 415

His Tyr Gly Pro Ile Pro Gly Ile Pro Val Gly Thr Met Trp Arg Phe
420 425 430

Arg Val Gln Val Ser Glu Ser Gly Val His Arg Pro His Val Ala Gly
435 440 445

Ile His Gly Arg Ser Asn Asp Gly Ser Tyr Ser Leu Val Leu Ala Gly
450 455 460

Gly Tyr Glu Asp Asp Val Asp His Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Thr Gly
465 470 475 480

Ser Gly Gly Arg Asp Leu Ser Gly Asn Lys Arg Thr Ala Glu Gln Ser
485 490 495

Cys Asp Gln Lys Leu Thr Asn Thr Asn Arg Ala Leu Ala Leu Asn Cys
500 505 510

Phe Ala Pro Ile Asn Asp Gln Glu Gly Ala Glu Ala Lys Asp Trp Arg
515 520 525

Ser Gly Lys Pro Val Arg Val Val Arg Asn Val Lys Gly Gly Lys Asn
530 535 540

Ser Lys Tyr Ala Pro Ala Glu Gly Asn Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Lys
545 550 555 560

Val Val Lys Tyr Trp Pro Glu Lys Gly Lys Ser Gly Phe Leu Val Trp
565 570 575

Arg Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Asp Glu Pro Gly Pro Trp Thr Lys
580 585 590

Glu Gly Lys Asp Arg Ile Lys Lys Leu Gly Leu Thr Met Gln Tyr Pro
595 600 605

Glu Gly Tyr Leu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Glu Arg Glu Lys Glu Asn
610 615 620

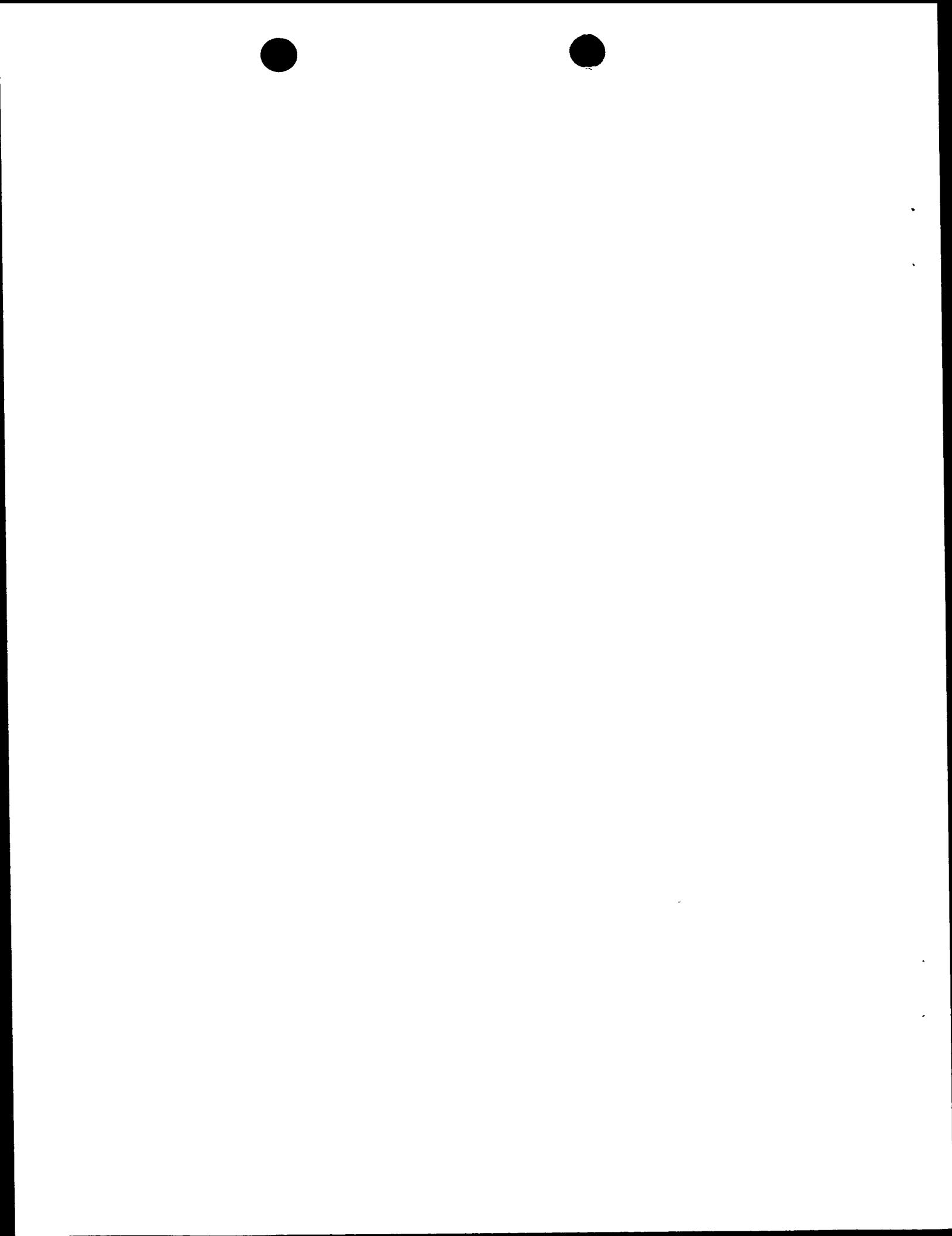
Ser Lys Arg Glu Glu Glu Glu Gln Gln Glu Gly Gly Phe Ala Ser Pro
625 630 635 640

Arg Thr Gly Lys Gly Lys Trp Lys Arg Lys Ser Ala Gly Gly Pro
645 650 655

Ser Arg Ala Gly Ser Pro Arg Arg Thr Ser Lys Lys Thr Lys Val Glu
660 665 670

Pro Tyr Ser Leu Thr Ala Gln Gln Ser Ser Leu Ile Arg Glu Asp Lys
675 680 685

Ser Asn Ala Lys Leu Trp Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Lys Asp Arg
690 695 700



7

Pro Ala Ser Gly Ser Pro Phe Gln Leu Phe Leu Ser Lys Val Glu Glu
 705 710 715 720

Thr Phe Gln Cys Ile Cys Cys Gln Glu Leu Val Phe Arg Pro Ile Thr
 725 730 735

Thr Val Cys Gln His Asn Val Cys Lys Asp Cys Leu Asp Arg Ser Phe
 740 745 750

Arg Ala Gln Val Phe Ser Cys Pro Ala Cys Arg Tyr Asp Leu Gly Arg
 755 760 765

Ser Tyr Ala Met Gln Val Asn Gln Pro Leu Gln Thr Val Leu Asn Gln
 770 775 780

Leu Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Arg
 785 790

<210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(45)

<400> 3
 acc cac ggt gag gcg gcc gag act gac agc agg cca gcc gat
 Thr His Gly Glu Ala Ala Ala Glu Thr Asp Ser Arg Pro Ala Asp
 1 5 10 15

45

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Thr His Gly Glu Ala Ala Ala Glu Thr Asp Ser Arg Pro Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(78)

<400> 5
 atg gtt gac aac ccc atg aga cggt aag agc ggg ccgt tcc tgc aag cac 48
 Met Val Asp Asn Pro Met Arg Arg Lys Ser Gly Pro Ser Cys Lys His
 1 5 10 15

tgc aag gac gac gtg aac aga ctc tgc agc

78



Cys Lys Asp Asp Val Asn Arg Leu Cys Ser
20 25

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Val Asp Asn Pro Met Arg Arg Lys Ser Gly Pro Ser Cys Lys His
1 5 10 15

Cys Lys Asp Asp Val Asn Arg Leu Cys Ser
20 25

<210> 7
<211> 525
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(525)

<400> 7
cga gag aag gag aac agc aag agg gag gag gag gag cag cag gag ggg 48
Arg Glu Lys Glu Asn Ser Lys Arg Glu Glu Glu Gln Gln Glu Gly
1 5 10 15

ggc ttc gcg tcc ccc agg acg ggc aag ggc aag tgg aag cgg aag tcg 96
Gly Phe Ala Ser Pro Arg Thr Gly Lys Gly Lys Trp Lys Arg Lys Ser
20 25 30

gca gga ggt ggc ccg agc agg gcc qgg tcc ccg cgc cgg aca tcc aag 144
Ala Gly Gly Pro Ser Arg Ala Gly Ser Pro Arg Arg Thr Ser Lys
35 40 45

aaa acc aag gtg gag ccc tac agt ctc acg gcc cag cag agc agc ctc 192
Lys Thr Lys Val Glu Pro Tyr Ser Leu Thr Ala Gln Gln Ser Ser Leu
50 55 60

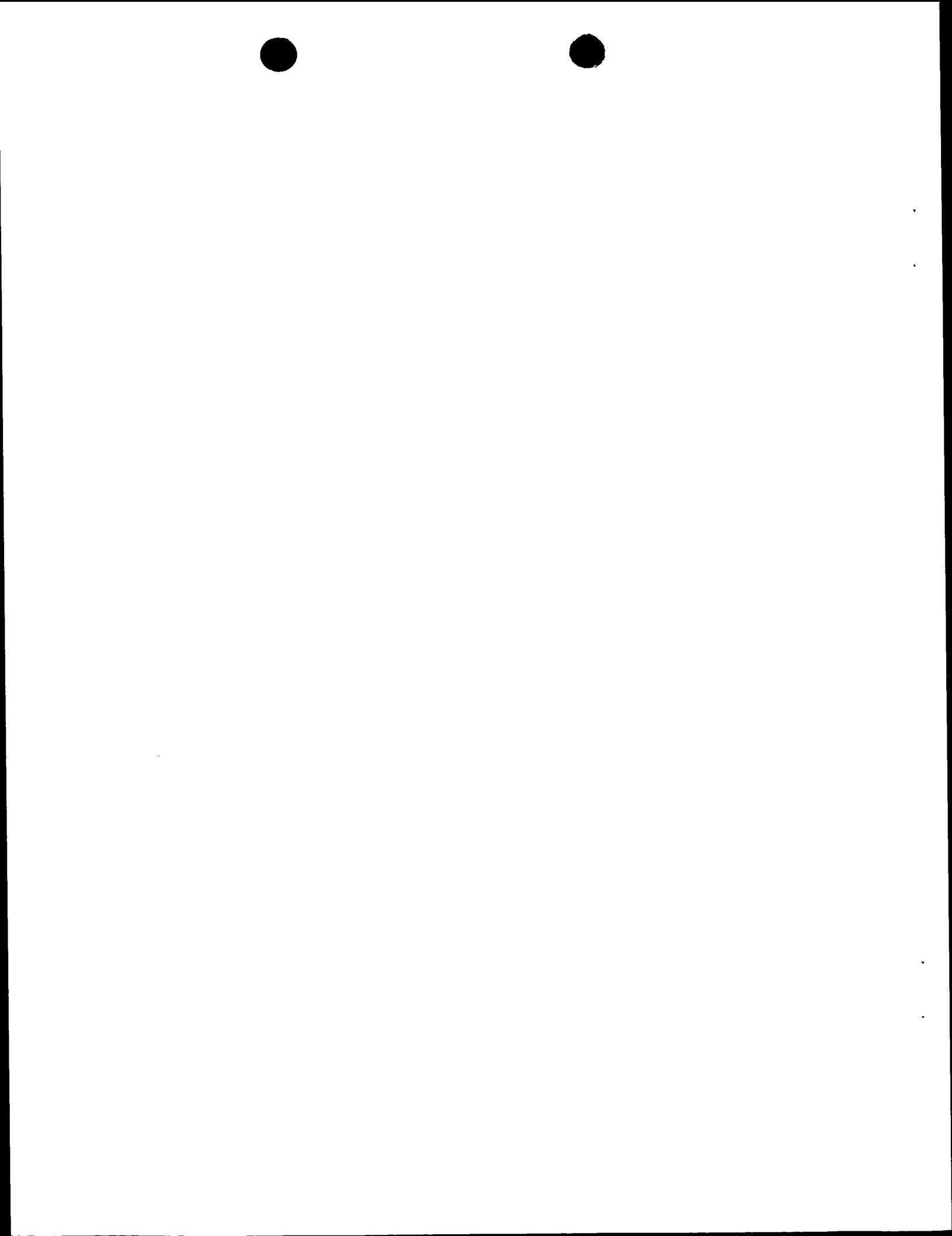
atc aga gag gac aag agc aac gcc aag ctg tgg aat gag gtc ctg gcg 240
Ile Arg Glu Asp Lys Ser Asn Ala Lys Leu Trp Asn Glu Val Leu Ala
65 70 75 80

tca ctc aag gac ccg ccg ggc agc ccg ttc cag ttg ttc ctg 288
Ser Leu Lys Asp Arg Pro Ala Ser Gly Ser Pro Phe Gln Leu Phe Leu
85 90 95

agt aaa gtg gag gag acg ttc cag tgt atc tgc tgt cag gag ctg gtg 336
Ser Lys Val Glu Glu Thr Phe Gln Cys Ile Cys Cys Gln Glu Leu Val
100 105 110

ttc cgg ccc atc acg acc gtg tgc cag cac aac gtg tgc aag gac tgc 384
Phe Arg Pro Ile Thr Thr Val Cys Gln His Asn Val Cys Lys Asp Cys
115 120 125

ctg gac aga tcc ttt cgg gca cag gtg ttc agc tgc cct gcc tgc cgc 432



Leu Asp Arg Ser Phe Arg Ala Gln Val Phe Ser Cys Pro Ala Cys Arg
 130 135 140

tac gac ctg ggc cgc agc tat gcc atg cag gtg aac cag cct ctg cag 480
 Tyr Asp Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Met Gln Val Asn Gln Pro Leu Gln
 145 150 155 160

acc gtc ctc aac cag ctc ttc ccc ggc tac ggc aat ggc cgg tga 525
 Thr Val Leu Asn Gln Leu Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Arg
 165 170 175

<210> 8
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Glu Lys Glu Asn Ser Lys Arg Glu Glu Glu Gln Gln Glu Gly
 1 5 10 15

Gly Phe Ala Ser Pro Arg Thr Gly Lys Gly Lys Trp Lys Arg Lys Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Pro Ser Arg Ala Gly Ser Pro Arg Arg Thr Ser Lys
 35 40 45

Lys Thr Lys Val Glu Pro Tyr Ser Leu Thr Ala Gln Gln Ser Ser Leu
 50 55 60

Ile Arg Glu Asp Lys Ser Asn Ala Lys Leu Trp Asn Glu Val Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Arg Pro Ala Ser Gly Ser Pro Phe Gln Leu Phe Leu
 85 90 95

Ser Lys Val Glu Glu Thr Phe Gln Cys Ile Cys Cys Gln Glu Leu Val
 100 105 110

Phe Arg Pro Ile Thr Thr Val Cys Gln His Asn Val Cys Lys Asp Cys
 115 120 125

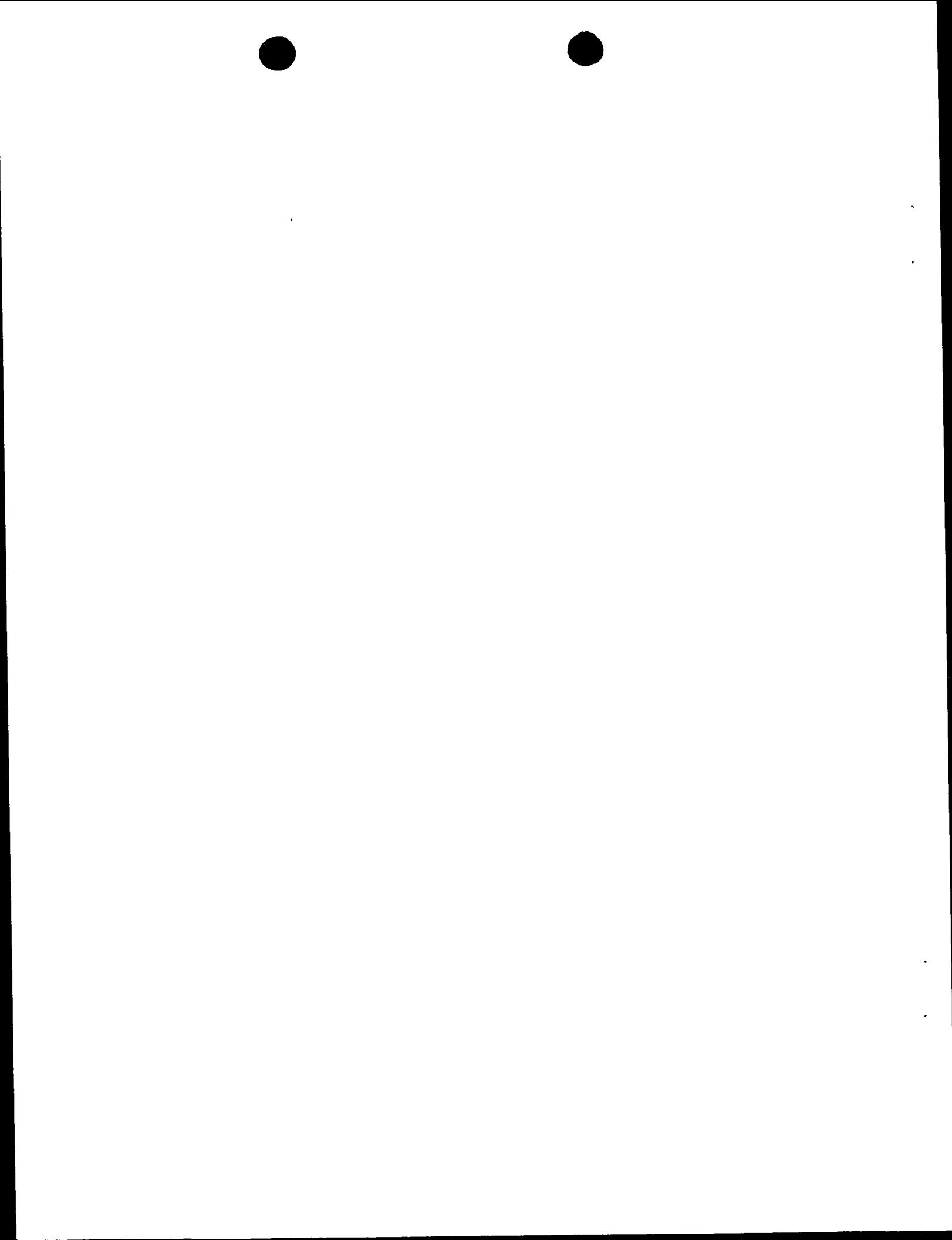
Leu Asp Arg Ser Phe Arg Ala Gln Val Phe Ser Cys Pro Ala Cys Arg
 130 135 140

Tyr Asp Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Met Gln Val Asn Gln Pro Leu Gln
 145 150 155 160

Thr Val Leu Asn Gln Leu Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Arg
 165 170

<210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atgtggatcc aggttcggac catggatggg aggcagaccc acacgggtgga ctcgctgtcc 60
 aggctgacca aggtggagga gctgaggcgg aagatccagg agctgttcca cgtggagcca 120



ggcctgcaga ggctgttcta cagggggcaaa cagatggagg acggccatac cctcttcgac 180
 tacgagggtcc gcctgaatga caccatccag ctccctggtcc gccagagccct cgtgtcccc 240
 cacagcacca aggagcggga ctccgagctc tccgacaccg actccggctg ctgcctggc 300
 cagagtgagt cagacaagtc ctcc 324

<210> 10
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

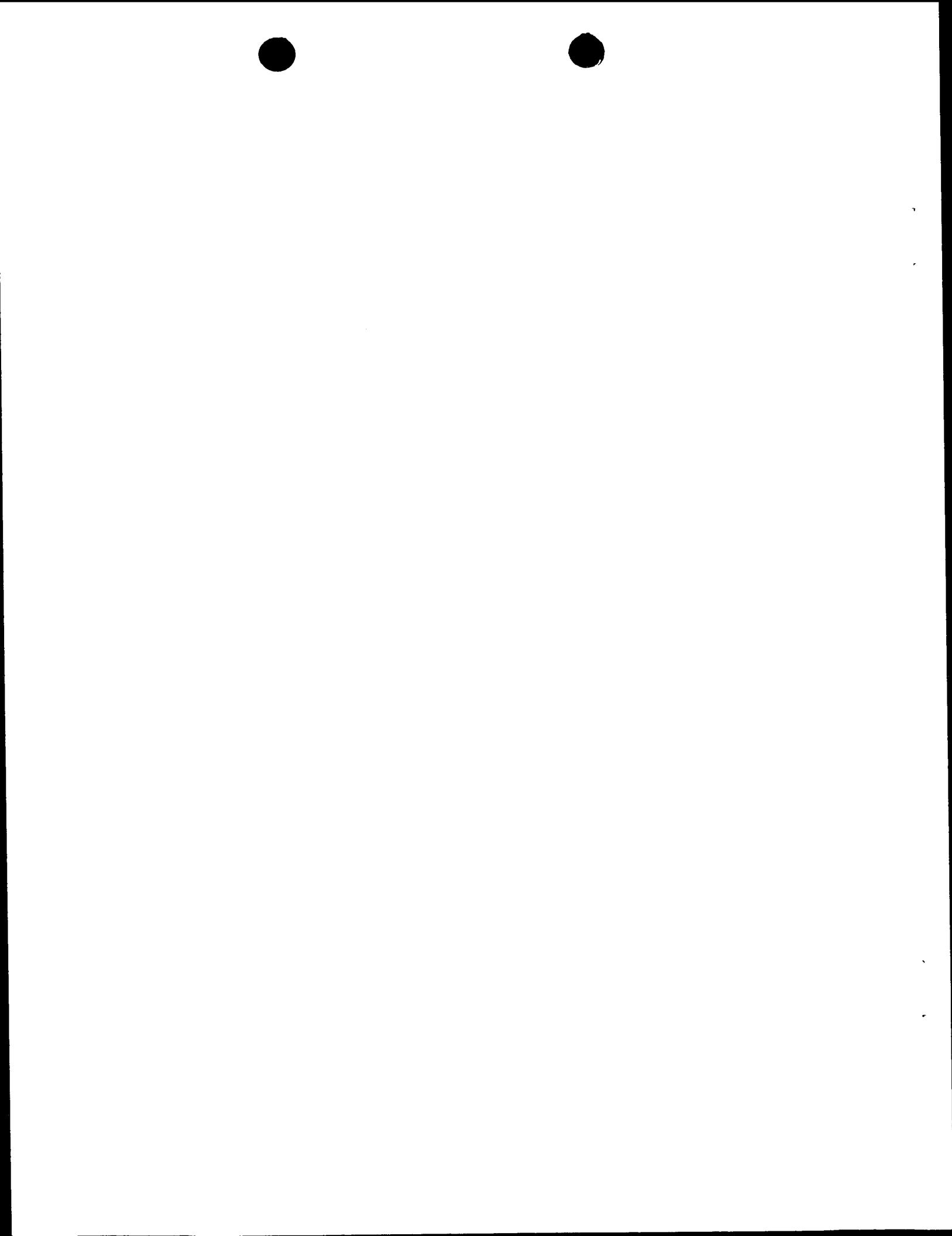
<400> 10
 gaggacatgt gggatgagac ggaattgggg ctgtacaagg tcaatgagta cgtcgatgct 60
 cgggacacga acatggggc gtggttttag ggcgcagggtgg tcagggtgac gcggaaaggcc 120
 ccctcccccggg acgagccctg cagctccacg tccaggccgg cgctggagga ggacgtcatt 180
 taccacgtga aatacgcacg ctacccggag aacggcgtgg tccagatgaa ctccagggac 240
 gtccgagcgc ggcgcgcac catcatcaag tggcaggacc tggaggtggg ccagggtggc 300
 atgctcaact acaacccca aaccccccaag gagcggggct tctggtacga cgcggagatc 360
 tccaggaagc gcgagaccag gacggcgcgg gaactctacg ccaacgtggt gctgggggat 420
 gattctctga acgactgtcg gatcatcttc gtggacgaag tcttcaagat tgagcggccg 480
 ggtgaaggga gcccc 495

<210> 11
 <211> 915
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gtctgcgcct gccacctgtg cggggggccgg caggaccccg acaagcagct catgtgcgt 60
 gagtgcgaca tggccttcca catctactgc ctggaccgc cccctcagca tgttccca 120
 gaggacgagt ggtactgccc ttagtgcggg aatgatgcca gcgagggtgt actggcggga 180
 gagccggctga gagagagcaa gaagaatgcg aagatggct cgccacatc gtcctcacag 240
 cgggactggg gcaaggccat ggcctgtgtg ggccgcacca agaataatgtac catgtcccg 300
 tccaaacctt acggaccat cccggggatc cccgtggca ccatgtggcg gttccgagtc 360
 caggtcagcg agtcgggtgt ccacgtggcc cacgtggctg gcatccatgg ccggagcaac 420
 gacggatctgt actccctagt cctggcgggg ggctatgagg atgatgtgga ccatggaaat 480
 ttttccat acacgggttag tggtggtcgat gatcttccg gcaacacaagag gaccgcggaa 540
 cagtcttgc atcagaaact caccacacc aacaggccgc tggctctcaa ctgctttgc 600
 cccatcaatg accaagaagg ggcgcaggcc aaggactggc ggtcggggaa gccggtcagg 660
 gtggtgcga atgtcaagg tggcaagaat agcaagtacg ccccccgtgaa gggcaaccgc 720
 tacatggca tctacaagg tggaaatac tggcccgaga aggggaagtc cgggtttctc 780
 gtgtggcgct accttctgcg gagggacgat gatgagcctg gcccttggac gaaggagggg 840
 aaggaccgga tcaagaagct gggctgacc atgcagtatc cagaaggcta cctgaaagcc 900
 ctggccaacc gagag 915

<210> 12
 <211> 1366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ggcagcgttt gccgagcggg cgctccgggt cgcacgcaag tccgcgcggg gtccggggca 60
 cgcacgcggg ttcatgcaca tccccagccg ggcgcaggccgc gcaggcagac aagctttcg 120
 cggcgcacggg agaggtgagc gggcgccgg ggtcgggtgt ccagcccgcc cccggcgcac 180
 ggggctcgaa aactttcccg cgccgcaccc cccggcgcac gcatgtcccc 240
 cactctgtcc cgggatccag ggcctccct tccacctaac cctcggaaat cgttcccg 300
 cacacatccg gctggagccg ggaccagccgc tgcgtcccc gagccccggc ggggttcgag 360
 cgcgcggggt gggggaggcc ctggcgagcc gccggggagg atgtcaggct cgcgcctgc 420
 ggcgcggccg ccccgcgatt caattgtcgcc gcccggcc gatccgcgc gcccctgagtt 480



ccccgggagc	atctgggcca	atggggagcg	agcggggcgg	ggcggccggg	tgctgcggag	540
ccaataagag	gcggctcaag	tgaagggggg	cgggacttga	cgagcgggggg	ccccctctgt	600
agtcccgcg	gcgggggtgg	gcgtgggctc	gctggcgcga	cccgcgccggg	ccagtggag	660
tgcgggaggg	acgcccggaggg	tccagggttt	ggaggggcgc	gagctgccgg	gggttggagg	720
tcgaggtgag	tcgcggggcg	cgcgcgctcg	cgggtggccg	ggacggggcg	cggttaccat	780
ggccaccgcg	gggcggggccc	ggtcgcgcac	gcgcgcgggg	ggggccggca	aggagggggg	840
gcgtgggcac	cgagggggtcc	cggggtccgc	ggatctcggg	tggggttttt	cccatttcag	900
tggcacttgg	ttaagttccc	ccgggacctt	ctgaagttcc	ggcccgcgct	ggactttctg	960
ggattccctc	ttccgtaaat	aggaatccga	ggaatgaatg	aatcaatgaa	tgaatgaata	1020
aacgaaccaa	ctcgggccac	ttggcccggg	cctccttct	cctctggtcg	tgggaagga	1080
gggatgggtt	ggaccttctg	ctttcttcc	aattccctct	ttcatttctc	cttccttcctc	1140
aatcttcaac	acttggctag	tcgttaatgc	cttaagtgt	taatttggtg	tgtctggtcc	1200
tggccagggt	ctggctgtac	aggaggactg	gaagggcata	ctgggagttt	cctgggtgtcc	1260
acaggccgga	caaaagcaac	cccgactctt	tagagcatgg	catggctcag	aggtgctgg	1320
aaaactgtatg	ggggtttatg	ctgtccctcc	cctcagcgcc	gacacc		1366

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/12	C07K14/435	C07K14/47	C12N15/10	C12N15/66
	C12N15/11	C12Q1/68	C07K16/18	G01N33/53	A61K51/00
	A61P35/00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PASCAL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 August 1998 (1998-08-18), XP002133353 HINXTON, GB AC= AI084125. qf23e08.x1 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1750886 3' similar to TR:015871 015871 UBIQUITIN ;, mRNA sequence. EST. abstract</p> <p>---</p> <p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 April 1997 (1997-04-18), XP002133354 HINXTON, GB AC= AA354253. EST62518 Jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA 5' end. abstract</p> <p>---</p> <p>---/---</p>	2,3,6,7
X		2,6,7

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2000

Date of mailing of the international search report

11/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FUJIMORI A. ET AL.,: "Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation." MAMMALIAN GENOME, vol. 9, no. 12, 1998, page 1032-1035 XP000890078 abstract; figure 1 page 1034, left-hand column, last paragraph -page 1035, right-hand column, paragraph 1 ---</p>	2,3,6,7, 27,29
A	<p>WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID ;IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 August 1998 (1998-08-27) page 3, line 1-10 page 4, line 27 -page 5, line 28 page 18, line 28 -page 19, line 30 page 20, line 19 -page 2, line 23 page 33, line 13 -page 35, line 15 page 36, line 15 -page 40, line 22; examples 1-3 ---</p>	1,12,13, 27,29-35
A	<p>SANDRI M I ET AL: "P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 22, 15 November 1996 (1996-11-15), pages 4464-4470, XP002068824 ISSN: 0305-1048 cited in the application abstract page 4469, left-hand column, last line -right-hand column, paragraph 3 ---</p>	1,27, 29-35
A	<p>ISAACS RJ T AL.,: "Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence arrested cells." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 July 1996 (1996-07-12), pages 16741-16747, XP002133355 cited in the application abstract page 16744, right-hand column, paragraph 2 -page 16746, left-hand column, paragraph 1 ---</p>	1,4,5,9, 10, 12-21, 27,29,31
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HERZOG C E AND ZWELLING L A: "Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase IIalpha promoter" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, 1997, pages 608-612, XP000877157 cited in the application page 609, right-hand column, last paragraph -page 612, left-hand column, last paragraph	1-5,10, 12-21, 27,29,31
A	LIM K ET AL.: "Reduced level of ATF is corelated with transcriptional repression of DNA topoisomerase IIalpha gene during TPA-induced differentiation of HL-60 cells" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 1, September 1998 (1998-09), pages 35-42, XP000900088 cited in the application abstract page 38, last paragraph -page 46, paragraph 1	1-5,27
A	KUBO T ET AL.: "DNA topoisomerase IIalpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 55, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 3860-3864, XP000877419 cited in the application page 3861, paragraph 3 -page 3864, paragraph 1	1-5,27
P,X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 3 April 2000 (2000-04-03), XP002148667 HINXTON, GB AC = AC027319. Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-518P12, WORKING DRAFT SEQUENCE, 84 unordered pieces. HTG; HTGS_DRAFT; HTGS_PHASE1. FROM NT 231122-232485. abstract	14

	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HOPFNER R ET AL.: "ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression." CANCER RESEARCH, vol. 60 (1), 1 January 2000 (2000-01-01), page 121-8 XP000884566 the whole document -----	1-36
P, X	WO 99 38972 A (CRKVENJAKOV RADOMIR ; JONES WILLIAM LEE (US); STACHE CRAIN BIRJIT () 5 August 1999 (1999-08-05) SEQ.ID.N.944 abstract page 5-6 page 55-57 -----	2,6,7, 16,20, 24,26, 29,30, 32,35,36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

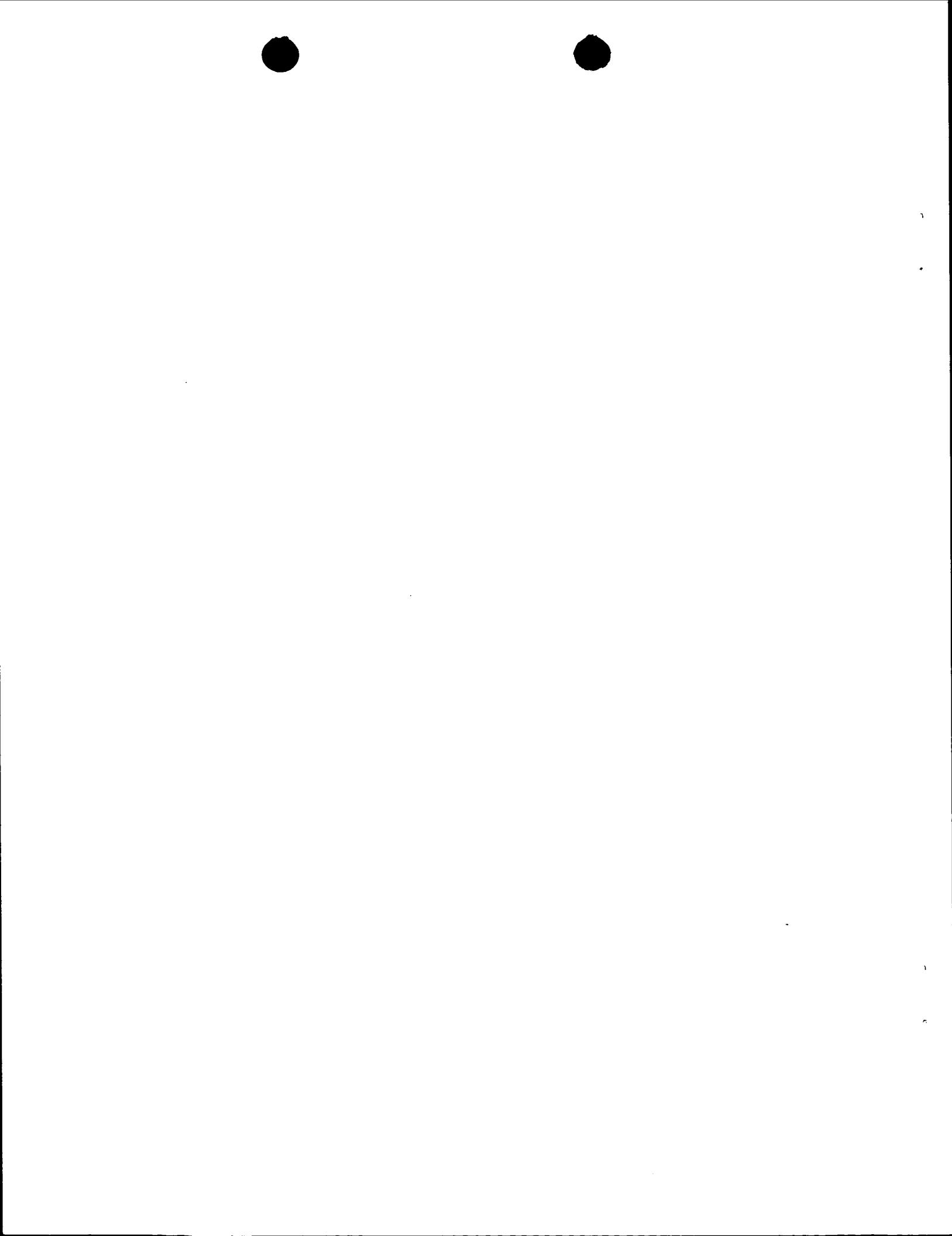
Information on patent family members

Internat

Publication No

PCT/FR 00/01747

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9837207 A	27-08-1998	AU	6300798 A	09-09-1998
WO 9938972 A	05-08-1999	AU	2471699 A	16-08-1999
		AU	2095599 A	19-07-1999
		AU	4187499 A	29-11-1999
		WO	9933982 A	08-07-1999
		WO	9958675 A	18-11-1999
		AU	6263999 A	17-04-2000
		WO	0018916 A	06-04-2000



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01747

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/12 C07K14/435 C07K14/47 C12N15/10 C12N15/66
C12N15/11 C12O1/68 C07K16/18 G01N33/53 A61K51/00
A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

STRAND, WPI Data, PAJ, EP0-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PASCAL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 août 1998 (1998-08-18), XP002133353 HINXTON, GB AC= AI084125. qf23e08.x1 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1750886 3' similar to TR:015871 015871 UBIQUITIN ;, mRNA sequence. EST. abrégé</p> <p>---</p>	2, 3, 6, 7
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 18 avril 1997 (1997-04-18), XP002133354 HINXTON, GB AC= AA354253. EST62518 Jurkat T-cells V Homo sapiens cDNA 5' end. abrégé</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	2, 6, 7

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FUJIMORI A. ET AL.,: "Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation." MAMMALIAN GENOME, vol. 9, no. 12, 1998, page 1032-1035 XP000890078 abrégé; figure 1 page 1034, colonne de gauche, dernier alinéa -page 1035, colonne de droite, alinéa 1 ---	2,3,6,7, 27,29
A	WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID ;IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 août 1998 (1998-08-27) page 3, ligne 1-10 page 4, ligne 27 -page 5, ligne 28 page 18, ligne 28 -page 19, ligne 30 page 20, ligne 19 -page 2, ligne 23 page 33, ligne 13 -page 35, ligne 15 page 36, ligne 15 -page 40, ligne 22; exemples 1-3 ---	1,12,13, 27,29-35
A	SANDRI M I ET AL: "P53 REGULATES THE MINIMAL PROMOTER OF THE HUMAN TOPOISOMERASE II ALPHAGENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 22, 15 novembre 1996 (1996-11-15), pages 4464-4470, XP002068824 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande abrégé page 4469, colonne de gauche, dernière ligne -colonne de droite, alinéa 3 ---	1,27, 29-35
A	ISAACS RJ T AL.,: "Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence arrested cells." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 juillet 1996 (1996-07-12), pages 16741-16747, XP002133355 cité dans la demande abrégé page 16744, colonne de droite, alinéa 2 -page 16746, colonne de gauche, alinéa 1 ---	1,4,5,9, 10, 12-21, 27,29,31
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/01747

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>HERZOG C E AND ZWELLING L A: "Evaluation of a potential regulatory role for inverted CCAAT boxes in the human topoisomerase IIalpha promoter" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, 1997, pages 608-612, XP000877157 cité dans la demande page 609, colonne de droite, dernier alinéa -page 612, colonne de gauche, dernier alinéa</p> <p>---</p>	1-5,10, 12-21, 27,29,31
A	<p>LIM K ET AL.: "Reduced level of ATF is corelated with transcriptional repression of DNA topoisomerase IIalpha gene during TPA-induced differentiation of HL-60 cells" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 1, septembre 1998 (1998-09), pages 35-42, XP000900088 cité dans la demande abrégé page 38, dernier alinéa -page 46, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-5,27
A	<p>KUBO T ET AL.: "DNA topoisomerase IIalpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 55, 1 septembre 1995 (1995-09-01), pages 3860-3864, XP000877419 cité dans la demande page 3861, alinéa 3 -page 3864, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-5,27
P,X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 3 avril 2000 (2000-04-03), XP002148667 HINXTON, GB AC = AC027319. <i>Homo sapiens</i> chromosome 19 clone CTC-518P12, WORKING DRAFT SEQUENCE, 84 unordered pieces. HTG; HTGS_DRAFT; HTGS_PHASE1. FROM NT 231122-232485. abrégé</p> <p>---</p>	14
P,X	<p>HOPFNER R ET AL.: "ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression." CANCER RESEARCH, vol. 60 (1), 1 janvier 2000 (2000-01-01), page 121-8 XP000884566 le document en entier</p> <p>---</p> <p align="center">-/-</p>	1-36

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>WO 99 38972 A (CRKVENJAKOV RADOMIR ; JONES WILLIAM LEE (US); STACHE CRAIN BIRJIT ()) 5 août 1999 (1999-08-05)</p> <p>SEQ.ID.N.944 abrégué page 5-6 page 55-57</p> <p>-----</p>	<p>2, 6, 7, 16, 20, 24, 26, 29, 30, 32, 35, 36</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux ...membre(s) de la famille de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01747

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9837207	A	27-08-1998	AU	6300798 A	09-09-1998
WO 9938972	A	05-08-1999	AU	2471699 A	16-08-1999
			AU	2095599 A	19-07-1999
			AU	4187499 A	29-11-1999
			WO	9933982 A	08-07-1999
			WO	9958675 A	18-11-1999
			AU	6263999 A	17-04-2000
			WO	0018916 A	06-04-2000

